

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología y Terapéutica



**FARMACOCINÉTICA COMPARADA DE PROGRAF Y ADVAGRAF Y
DESARROLLO DE MODELOS CLÍNICO-GENÉTICOS PARA LA PREDICCIÓN
DE LA DISPOSICIÓN DE TACROLIMUS EN NIÑOS TRASPLANTADOS**

TESIS DOCTORAL

GONÇALO N. DE ALMEIDA PAULO

MADRID, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología y Terapéutica



**FARMACOCINÉTICA COMPARADA DE PROGRAF Y ADVAGRAF Y
DESARROLLO DE MODELOS CLÍNICO-GENÉTICOS PARA LA PREDICCIÓN
DE LA DISPOSICIÓN DE TACROLIMUS EN NIÑOS TRASPLANTADOS**

Memoria para optar al título de Doctor en Medicina presentada por:

D. Gonçalo N. de Almeida Paulo

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de medicina.
Universidad Autónoma de Madrid

DIRECTOR DE TESIS:

Prof. Dr. Antonio J. Carcas Sansuán

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.

MADRID, 2018

D. ANTONIO J. CARCAS SANSUAN, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR
TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA DE LA
FACULTAD DE MAEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

INFORMA:

Que D. GONÇALO NUNO DE ALMEIDA PAULO ha realizado bajo mi
dirección la Tesis Doctoral “FARMACOCINÉTICA COMPARADA DE
PROGRAF Y ADVAGRAF Y DESARROLLO DE MODELOS CLÍNICO-GENÉTICOS
PARA LA PREDICCIÓN DE LA DISPOSICIÓN DE TACROLIMUS EN NIÑOS
TRASPLANTADOS”

Estimo que su trabajo es novedoso y original, además de reunir los
requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser
aceptado para su presentación

Madrid, 2018

Antonio J. Carcas Sansuán

“El camino a la excelencia no tiene límite de velocidad.”

(David Johnson)

“El éxito en la vida consiste en seguir siempre adelante.”

(Samuel Johnson)

“En algún lugar, algo increíble est  esperando ser conocido.”

(Carl Sagan)

A mis padres y hermano, por su apoyo incondicional

A mi mujer Laura

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Antonio J. Carcas, director de esta Tesis Doctoral, porque sin su orientaci3n, dedicaci3n y paciencia nunca se podr3a haber realizado este trabajo. Es tambi3n una referencia en el buen hacer y en la dedicaci3n en todos los aspectos de la vida.

Al Doctor Jes3s Fr3as, Jefe de Servicio de Farmacolog3a Cl3nica del Hospital Universitario La Paz y Director del Departamento de Farmacolog3a y Terap3utica, por su apoyo incondicional en la realizaci3n de este proyecto, y por el desaf3o constante que es trabajar codo con codo con una persona a la vez tan exigente y en constante b3squeda de la excelencia.

Al Doctor Rub3n Lubomirov por su constante b3squeda de la perfecci3n en cualquiera de las tareas en las que se implica y el aprendizaje que conlleva.

A la Dra. Paloma Jara y Dra. Laura Espinosa, Responsable del Servicio de Hepatolog3a Pedi3trica y Jefa del Servicio de Nefrolog3a Pedi3trica del Hospital La Paz respectivamente; por su colaboraci3n y por reclutar los pacientes que posibilitaron estos estudios.

A todos los profesionales de la Unidad de Ensayos Cl3nicos del Departamento de Farmacolog3a Cl3nica y del Servicio de Farmacolog3a Cl3nica del Hospital La Paz, porque es siempre un placer trabajar con gente tan dedicada y tan profesional y porque todos ellos han contribuido de alguna forma para la realizaci3n de este trabajo.

A mis padres, Ant3nio y Margarida, y a mi hermano, Miguel, por su apoyo, cari3o y dedicaci3n. Porque fueron ellos que han inculcado en mi los valores y principios que me hacen ser quien soy.

A mi mujer, Laura, porque ya dec3a Arqu3medes que necesitaba un punto de apoyo para mover el mundo, y el m3o es ella.

Por 3ltimo pero no porque sean los menos importantes a todos los pacientes y sus padres que han participado en estos estudios. Sin su desinteresada participaci3n no hubiera sido posible este proyecto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	1
1.1. Introducción	2
1.2. Materiales y métodos.....	3
1.3. Resultados	3
1.4. Conclusiones.....	4
INTRODUCCIÓN	7
2.1. Inmunosupresión en trasplantes	8
2.2. Tacrolimus	11
2.2.1. Farmacocinética	13
2.2.2. Farmacogenética	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	18
PACIENTES Y MÉTODOS	20
5.1. Artículos publicados.....	22
RESULTADOS	24
6.1. Conversión de Prograf a Advagraf en pacientes trasplantados de hígado y seguimiento de 1 año tras la conversión.	25
6.2. Conversión de Prograf a Advagraf en pacientes trasplantados renales y seguimiento de 1 año tras la conversión.	37
6.3. Desarrollo de estrategias de muestreo abreviado LSS.....	46
6.4. Peso de los genotipos de ABCB1 y POR en pacientes trasplantados de riñón que no expresan CYP3A5 con tratamiento estable de TAC.	57
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS	91

Tesis Doctoral

D. Gonçalo N. de Almeida Paulo

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS

ABC: rea Bajo la Curva de concentraciones.

ABCB1: ATP binding cassette sub-familia B1

ALT: Alanino aminotransferasa

ASC: rea de la superficie corporal

AST: Aspartato aminotransferasa

ABC₀₋₂₄: rea bajo la curva de concentraciones durante un periodo de 24 horas

Cl_{oral}: Aclaramiento oral

CYP 3A5: citocromo P450 3A5

DS: Desviaci3n Standard

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

IC: Intervalo de confianza

IMC: ndice de masa corporal

LSS: Limited Sampling Strategies (estrategias de muestreo abreviado)

MAE: Error medio absoluto

ME: Error medio

MSUD: Enfermedad de orina con olor a jarabe de arce

PG: farmacogen3tica

PK: farmacocin3tica

POR: enzima oxido reductasa

SD: Desviaci3n Est3ndar

SNP: Single Nucleotide Polymorphisms

T_{max}: Tiempo al que se alcanza la concentraci3n m3xima

t_{1/2}: Tiempo de vida medio

ÍNDICE DE TABLAS

2. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inmunosupresores mecanismos de acci3n.....	10
Tabla 2. Rasgos comparativos de los inhibidores de calcineurina, ciclosporina y TAC adaptado de referencias 19, 20 y 21	11
Tabla 3. Características demogrÁficas y clÍnicas de los pacientes incluidos.	31
Tabla 4. Principales parÁmetros farmacocinÉticos de TAC despu3s de la ingesta de Prograf y Advagraf.....	33
Tabla 5. Frecuencia genotÍpica de los pacientes para CYP3A5, ABCB1 y los dos POR analizados.....	33
Tabla 6. Características demogrÁficas y clÍnicas de los pacientes incluidos.	42
Tabla 7. Valores de concentraci3n media de TAC tras la ingesta de Prograf o Advagraf a las 0, 12 y 24 horas.	43
Tabla 8. Principales parÁmetros de disposici3n del Prograf y del Advagraf y bioequivalencia.	43
Tabla 9. ParÁmetros de disposici3n primarios del TAC tras la ingesta de Prograf en ambos trasplantes.....	49
Tabla 10. ParÁmetros de disposici3n primarios del TAC tras la ingesta de Advagraf en ambos trasplantes.....	49
Tabla 11. Presentaci3n de las mejores LSS desarrolladas para Prograf y Advagraf en trasplante hepÁtico y renal y de las LSS desarrolladas utilizando solamente como variable la concentraci3n a tiempo 0.....	52
Tabla 12. Presentaci3n de las mejores LSS desarrolladas en trasplante hepÁtico y renal y de las LSS desarrolladas utilizando solamente como variable la concentraci3n a tiempo 0 independientemente de la formulaci3n.....	53
Tabla 13. Presentaci3n de las mejores LSSs desarrolladas para Prograf y para Advagraf y de las LSS desarrolladas utilizando solamente como variable la concentraci3n a tiempo 0 independientemente del trasplante.....	54
Tabla 14. Presentaci3n de las mejores LSSs desarrollada y la LSS utilizando solamente como variable la concentraci3n a tiempo 0 independientemente del trasplante y de la formulaci3n.	56
Tabla 15. NÚmero de predicciones con error superior a 15% o a 20% en valor absoluto (MAE%) cuando comparadas con los valores reales de ABC_{0-24} obtenidos con la LSS desarrollada solo con C_0 y la LSS desarrollada con las concentraciones a tiempos 0, 1 y 4 ($C_{0,1,4}$).....	56
Tabla 16. Características de los pacientes.....	61
Tabla 17. Comparaci3n de los principales parÁmetros farmacocinÉticos ajustados por dosis y peso segÚn los diferentes genotipos analizados.	62

Tabla 18. Valores del test de tendencia de Jonckheere-Terpstra realizado a los 17 pacientes que no expresan CYP3A5 divididos por el score genético creado.	63
Tabla 19. Modelos desarrollados y sus respectivos MAE% para los valores de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min}	65

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño simplificado del estudio de conversi3n de Prograf a Advagraf en pacientes adolescentes trasplantados de h3gado.....	26
Figura 2. Concentraci3n media de TAC tras la ingesta de cada una de las formulaciones	32
Figura 3. Representaciones de la evoluci3n de los principales par3metros anal3ticos	35
Figura 4. Niveles de TAC en sangre, dosis de TAC y ratio dosis/nivel de TAC durante el año de seguimiento de los pacientes.....	36
Figura 5. Concentraci3n media de TAC tras la ingesta de cada una de las formulaciones	43
Figura 6. Representaciones de la evoluci3n de los valores de cistatina C y de Creatinina a lo largo de un año de seguimiento	44
Figura 7. Dosis de Advagraf, nivel de TAC en sangre, ratio dosis/nivel y ratio dosis/nivel ajustado por peso de TAC durante el año de seguimiento de los pacientes	45
Figura 8. Concentraci3n media de TAC obtenida de los 41 pacientes convertidos de Prograf a Advagraf.	49
Figura 9. Representaci3n del IC 95%, r ² y MAE% en la predicci3n del ABC ₀₋₂₄ de las mejores LSS desarrolladas para Prograf y Advagraf en trasplante hep3tico y renal.....	51
Figura 10. Representaci3n del IC 95%, r ² y MAE% en la predicci3n del ABC ₀₋₂₄ de las mejores LSS desarrolladas en trasplante hep3tico y renal independientemente de la formulaci3n	53
Figure 11. Representaci3n del IC 95%, r ² y MAE% en la predicci3n del ABC ₀₋₂₄ de las mejores LSS desarrolladas para Prograf y para Advagraf independientemente del trasplante	54
Figura 12. Representaci3n del IC 95%, r ² y MAE% en la predicci3n del ABC ₀₋₂₄ de las mejores LSS desarrolladas independientemente del trasplante y de la formulaci3n.....	55
Figura 13. Distribuci3n de los valores de ABC ₀₋₂₄ , C _{max} y C _{min} ajustados por dosis y peso.	63

RESUMEN

1. RESUMEN

1.1. Introducci3n

El cumplimiento terap3utico, una correcta dosificaci3n y un correcto control de los inmunosupresores en pacientes trasplantados son tres de los pilares fundamentales para incrementar la esperanza media de vida con una buena calidad de vida para estos pacientes.

Los inmunosupresores son f3rmacos con estrecho margen terap3utico y por ello, son f3rmacos que con peque ˜as variaciones de dosis, pueden originar toxicidad o hacer que los pacientes se encuentren infra-dosificados, de forma que aumenta el riesgo de eventos asociados o que conlleven a un rechazo del injerto.

Uno de los f3rmacos inmunosupresores m3s utilizados actualmente es el Tacrolimus, cuyo mecanismo de acci3n se basa en la inhibici3n de la calcineurina. Este f3rmaco se presenta en varias formas farmac3uticas distintas y, al igual que los dem3s inmunosupresores, tambi3n se caracteriza por su estrecho margen terap3utico.

Su farmacocin3tica ha sido estudiada por varios grupos de investigadores, demostrando que su concentraci3n en sangre tiene una gran variabilidad intra e inter individual, lo que hace m3s dif3cil su correcta monitorizaci3n.

Conociendo estos datos, se delinearon 5 objetivos en nuestro trabajo:

- Estudiar la adecuaci3n del cambio de formulaci3n de Prograf a Advagraf en pacientes pedi3tricos trasplantados de ri ˜n3n o h3gado;
- Desarrollar estrategias de muestreo abreviado de forma que se pueda predecir de forma sencilla y pr3ctica la concentraci3n de Tacrolimus en sangre;
- Describir la frecuencia de aparici3n en los pacientes trasplantados de h3gado o ri ˜n3n de los polimorfismos de los genes CYP3A5*3 c.6986A>G (rs776746), ABCB1 c.3435 C>T (rs1045642) y POR c.1508C>T (rs1057868) y c.188+6405A>G (rs2868177);
- Evaluar la repercusi3n del polimorfismo de estos genes de forma individual o formando haplotipos, sobre los par3metros farmacocin3ticos del TAC en pacientes pedi3tricos con trasplante renal;

- Comprobar si los genotipos estudiados pueden explicar el comportamiento farmacocinético del TAC en los individuos trasplantados de riñón.

1.2. Materiales y métodos

Todos los datos para los estudios realizados se obtuvieron de pacientes que han participado en los ensayos clínicos con número de registro Eudra CT 2008-001440-39 y Eudra CT 2009-017600-89, después de la firma del respectivo consentimiento informado. Estos pacientes se encontraban en tratamiento estable con Prograf (variación de dosis inferior al 20% durante 2 controles). A lo largo de los ensayos clínicos se registraron todos los acontecimientos clínicos de relevancia, todas las modificaciones de dosis del Tacrolimus y de la medicación concomitante, así como todos los datos de las analíticas realizadas a lo largo de un año que se recogieron a los 30, 90, 180 y 360 días. Las concentraciones de Tacrolimus en sangre durante 24 horas se han obtenido en el día 0 para el Prograf y en el día 7 para el Advagraf, siendo este séptimo día, el día de la conversión de Prograf a Advagraf. Se realizó un análisis basado en regresiones lineales utilizando todas las combinaciones posibles de 3 o menos puntos de extracción hasta las 4 horas tras la ingesta de Tacrolimus para determinar cuál era la mejor combinación de puntos para determinar el AUC₀₋₂₄ de este fármaco. La muestra genética de los pacientes se obtuvo en el día 0, y los diferentes genotipos se determinaron por medio de sondas Tacman. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa IBM SPSS Statistics 19.0.

1.3. Resultados

Los pacientes transferidos de Prograf a Advagraf se mantuvieron estables sin episodios de toxicidad o de rechazo en ambos tipos de trasplante. En los pacientes trasplantados de hígado, los coeficientes de variación interindividual para los principales marcadores de biodisponibilidad han sido similares entre las dos formulaciones: 28,20% y 28,50% para C_{max} y para AUC₀₋₂₄ respectivamente para

Prograf y 29,10% y 28,80% respectivamente para Advagraf. No se han encontrado diferencias entre hombres y mujeres en estos parámetros tras haber ajustado los valores por dosis y peso. Al hacer el estudio estadístico de bioequivalencia para ABCO-24 entre las dos formulaciones encontramos que el intervalo de confianza al 90% para Advagraf/Prograf fue de 90,8 a 112,1.

Para los pacientes trasplantados de riñón, los niveles de Tacrolimus disminuyeron entre los meses 1 y 6. La dosis fue aumentando a lo largo del tiempo durante el año de seguimiento empezando en el día 90. Dado que muchos de los pacientes incluidos son niños de baja edad y están sujetos a grandes variaciones de peso en cortos periodos de tiempo, también se calculó el ratio entre la dosis y el peso, encontrándose una diferencia clínicamente significativa entre los días 90 y 180, pero no al año.

La selección de la LSS más exacta se hizo comparando r^2 , ME y MAE siendo la mejor LSS para pacientes trasplantados de hígado CO_1.5_4 ($r^2 = 0.939$), para trasplante de riñón CO_1_3 ($r^2 = 0.925$), para Prograf con datos de ambos trasplantes es la LSS CO-1-3 ($r^2 = 0.920$), para advagraf con datos de ambos trasplantes es la LSS CO_0.5_4 ($r^2 = 0.926$). Teniendo en cuenta todos los datos a la vez sin tener en consideración tipo de trasplante ni tipo de formulación, la mejor LSS es CO_1_4 ($r^2 = 0.898$).

Se hicieron varios análisis multivariantes lineales y se pudo determinar que los genotipos de CYP3A5 son los que más contribuyen para la variabilidad de las concentraciones de Tacrolimus. Para los pacientes CYP3A5 mutados se creó un modelo genético que explica el 13.7% y el 26.5% de la variabilidad total del AUC0-24 y Cmin respectivamente.

1.4. Conclusiones

Con los estudios realizados fue posible llegar a 6 conclusiones:

- La sustitución de la formulación de liberación normal Prograf por la formulación de liberación lenta Advagraf, demostró ser adecuada en ambas poblaciones estudiadas, ya que sus parámetros farmacocinéticos han demostrado ser similares con ambas

formulaciones, y todos los pacientes han permanecido estables hasta un año tras la conversi3n;

- Se han desarrollado cuatro grupos de LSSs con los datos de los pacientes estudiados. La aplicaci3n de las LSS desarrolladas, demuestran ser muy precisas por lo que facilitar3n la monitorizaci3n de estos pacientes;
- La frecuencia de los genotipos de CYP3A5*3 c.6986A>G (rs776746), ABCB1 c.3435 C>T (rs1045642) y POR c.1508C>T (rs1057868) y c.188+6405A>G (rs2868177) de los pacientes trasplantados de rin3n, se ha estudiado y queda descrita en la tablas 5 y 16 de esta memoria. Adicionalmente podemos concluir que la distribuci3n al3lica de la poblaci3n estudiada sigue el equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos estudios realizados;
- Los 3nicos polimorfismos estudiados en los pacientes trasplantados de rin3n que por s3 mismos presentan influencia estad3sticamente significativa en los par3metros farmacocin3ticos del TAC, son los del CYP3A5 ya que existe una diferencia muy marcada entre el grupo de pacientes que expresa CYP3A5 y el grupo de pacientes que no lo expresan. Los polimorfismos del gen CYP3A5 explican casi el 40% de la variabilidad de ABC0-24, casi el 21% de la variabilidad de Cmax y casi el 60% de la variabilidad de Cmin;
- El modelo farmacogen3tico desarrollado permite explicar un porcentaje muy importante de la variabilidad farmacocin3tica del TAC, habi3ndose encontrado una relaci3n muy significativa entre el uso de Deflazacort y los par3metros farmacocin3ticos, algo poco mencionado en la literatura. Estos resultados deber3n ser confirmados en cohortes de pacientes independientes;
- El modelo farmacogen3tico y las estrategias LSS desarrolladas, podr3n contribuir a mejorar la individualizaci3n de la dosificaci3n de estos pacientes.

INTRODUCCI3N

2. INTRODUCCI3N

2.1. Inmunosupresi3n en trasplantes

La inmunosupresi3n de los sujetos receptores de un injerto33rgano se hace con el objetivo de evitar el rechazo agudo y cr3nico del 3rgano trasplantado. Este rechazo es resultado de la incompatibilidad gen3tica entre donante y receptor que hace reaccionar al sistema inmunitario del receptor contra los ant3genos de histocompatibilidad del donante (1). La inmunosupresi3n conlleva riesgos importantes al afectar la capacidad de defensa frente a las infecciones y tambi3n el desarrollo de tumores. El 3xito del trasplante reside en una correcta modulaci3n de la inmunosupresi3n que mantenga este dif3cil equilibrio entre rechazo con riesgo de p3rdida del injerto e infecciones con riesgo de p3rdida del individuo (2,3). Como podemos ver en la tabla 1 existen varios f3rmacos con capacidad inmunosupresora con diferentes mecanismos de acci3n y con diferente potencia, siendo los m3s actuales cada vez m3s potentes y m3s selectivos. Este mecanismo de acci3n cada vez m3s selectivo es debido fundamentalmente a los avances en el conocimiento de la inmunobiolog3a del rechazo, ya que nos permite conocer cada vez mejor los mecanismos de acci3n de los f3rmacos y al mismo tiempo conocer cu3les son los puntos clave de la reacci3n inmunitaria, cuyo bloqueo es m3s efectivo para evitar el rechazo. La inmunosupresi3n debe adaptarse a las distintas fases post-trasplante:

- Fase inicial o de inducci3n, en que la capacidad de reacci3n del receptor es m3xima; se administran dosis altas de varios f3rmacos: corticoesteroides, ciclosporina o Tacrolimus (TAC), azatioprina en los protocolos triples e incluso anticuerpos monoclonales o policlonales anti linfocitarios en protocolos de cu3druple terapia.
- Fase de mantenimiento, donde se pueden disminuir las dosis de inmunosupresi3n al m3nimo necesario.
- Rechazo agudo, en la que debemos administrar r3pidamente dosis altas de corticoides y ajustar los niveles de la inmunosupresi3n basal (ciclosporina o TAC) para asegurar un nivel terap3utico. Si el rechazo no responde a los

corticoides se puede optar por administrar anticuerpos monoclonales OKT3 durante 7 a 14 días.

La tendencia actual es evitar, si es posible, las globulinas anti linfocitarias y convertir precozmente a TAC a los pacientes que presentan rechazos córtico-resistentes mientras reciben ciclosporina, o añadir ácido micofenólico que ha demostrado su efectividad en el trasplante renal (4-9)

Los estudios realizados en los últimos 20 años nos permiten acumular una gran experiencia y un gran conocimiento sobre la inmunosupresión que nos lleva a la necesidad de una cada vez mayor adaptación a las circunstancias de cada receptor; sexo, edad, raza, tipo de trasplante, enfermedades concomitantes, enfermedades víricas, estado general del paciente etc. (10,11) Actualmente, además de asegurar la supervivencia del paciente y su injerto  rgano hay que velar también por la calidad de vida del paciente trasplantado y la capacidad del mismo para realizar sus actividades diarias con normalidad, así como por adaptar el tratamiento inmunosupresor a los diferentes cambios que cada paciente puede tener a lo largo de su vida: maternidad, ejercicio físico, cambios est ticos, obesidad, arterioesclerosis, riesgo cardiovascular, neoplasias de novo etc. Los efectos secundarios y tóxicos de los distintos inmunosupresores (hipertensión arterial, disfunción renal, diabetes, alteraciones oculares, osteopatía, hipercolesterolemia, efecto anticanceroso de algunos fármacos etc.), deben valorarse en el momento de decidir el mejor tratamiento inmunosupresor para un receptor determinado, que puede presentar alguna de estas patologías antes del trasplante. Finalmente, la posibilidad de adquirir un estado de tolerancia específico, definido como la ausencia de rechazo del aloinjerto una vez retirada toda la inmunosupresión, sería la gran panacea del trasplante de  rganos.

Tabla 1. Inmunosupresores mecanismos de acci3n

Inmunosupresores Mecanismo de Acci3n	
Fase G-0, funci3n macr3fago-monocitaria (APC,MHC-TCR/CD3, IL-1, IL-6	Corticosteroides OKT3: anti CD3 monoclonal murino ALG, ATG: anti-T policlonal Deoxyspergualina
Fase G-1, S3ntesis de citoquinas Transducci3n de la señal IL-2, IL-2R	Ciclosporina A, Neoral, Anticalcineurina Tacrolimus, Anticalcineurina Anti IL-2R monoclonales <ul style="list-style-type: none"> - Quim3rico: Basiliximab - Humanizado: Daclizumab Rapamicina (Sirolimus), P70 S6 Kinasa Everolimus SDZ-RAD
Fase S, S3ntesis de DNA Proliferaci3n de las c3lulas T	Azatioprina Mofetil Micofenolato Brequinar s3dico Mizoribina Leflunimida

La inmunosupresi3n es imprescindible en todos los tipos de trasplantes para prevenir el fallo del injerto3rgano. Se ha determinado que el no cumplimiento del tratamiento es un factor de riesgo muy significativo en los m3s variados trasplantes (12,13). El no cumplimiento terap3utico afecta particularmente a las dosis de la tarde y noche y es m3s evidente en poblaci3n pedi3trica, 50% de los niños con trasplante de un 3rgano consideran que el r3gimen de dos dosis diarias es inapropiado (14). La tercera mayor causa de mortalidad tard3a en pacientes trasplantados de h3gado es la no adherencia al tratamiento (15) y se verifica que los pacientes trasplantados de ri3n son los pacientes con mayor tasa de incumplimiento terap3utico, quiz3s debido a la naturaleza no vital de este 3rgano (16,17)

2.2. Tacrolimus

El Tacrolimus (TAC) es un principio activo con potente acci3n inmunosupresora descubierto en Jap3n, con estructura de macr3lido lactona, que se obtiene del hongo *Streptomyces tsukubaensis*. Se encuentra en el grupo de los inhibidores de la calcineurina junto con la ciclosporina; la comparaci3n entre estos dos f3rmacos queda reflejada en la tabla 2. Actualmente el TAC se utiliza en la mayor3a de los pacientes pedi3tricos con alg3n tipo de trasplante de 3rgano. Se caracteriza por su estrecho margen terap3utico y una gran variabilidad inter e intra-individual (18).

Tabla 2. Rasgos comparativos de los inhibidores de calcineurina, ciclosporina y TAC adaptado de referencias 19, 20 y 21

	Ciclosporina	Tacrolimus
Dosis de mantenimiento	$\pm 3\text{-}5\text{ mg/kg/d3a}$	$\pm 0.15\text{-}0.30\text{ mg/kg/d3a}$
V3a de administraci3n	Oral e iv.	Oral e iv
C3psulas disponibles	25, 50 y 100mg	0.5, 1, 5mg
Interacci3n	Similar	Similar
Capacidad anti-rechazo (agudo)	+	++
Uso con MMF	+ (2g)	+ (1g)
Uso con Sir3limus / Ever3limus	+ *	+
Nefrotoxicidad	+	+
Ahorro esteroides	+	++
Hipertensi3n y aumento de sodio	++	+
Toxicidad pancre3tica	+	++
Neurotoxicidad	+	++
Hirsutismo	+	-
P3rdida de cabello	-	+
Hipertrofia de enc3as	++	-
Dispesia	-	+
Motilidad g3strica	-	+
Hierpakalemia	+	+
Hipomagnesia	+	+
Hipercolesterolemia	+	-
Hiperuricemia / gota	++	+

(-) no efecto o escaso

(+) efecto conocido

(++) efecto m3s pronunciado

MMF- Micofenolato mofetil

* Separar la toma de Sir3limus 4 horas de la ciclosporina. Se puede tomar el Eve3limus junto con la ciclosporina o Tacr3limus. A dosis altas incrementa la nefrotoxicidad.

Su mecanismo de acci3n es similar a la ciclosporina pero entre 10 a 100 veces m3s potente. Se une a una prote3na citoplasm3tica (FKBP) e inhibe a la calcineurina fosfatasa bloqueando al factor de transcripci3n responsable de la s3ntesis de citoquinas

(IL2, IL-3, IL-4, TNF, INF) por procesos calciodependientes. La inhibici3n de la calcineurina se realiza por una uni3n de alta afinidad a inmunofilinas FKBP12, formando un complejo Tacrolimus-inmunofilinas. El complejo que se forma se une de forma competitiva y espec3fica a la calcineurina e impide su actividad fosfatasa. Una vez bloqueada la actividad fosfatasa de la calcineurina, se impide la transcripci3n de un grupo espec3fico de genes de linfocinas, bloqueado as3 la transducci3n de un factor nuclear imprescindible para la activaci3n de linfocitos B y T. En conclusi3n el bloqueo producido por el TAC a nivel de la calcineurina, inhibe la activaci3n de linfocitos citot3xicos que son los principales responsables del rechazo de 3rganos trasplantados. A diferencia de la ciclosporina, el TAC presenta otras propiedades adicionales, como son la inhibici3n de otras citoquinas y del factor de crecimiento beta (TGF beta). Los efectos t3xicos, como es l3gico, dado su mecanismo de acci3n similar, son muy parecidos a la ciclosporina: nefrotoxicidad, neurotoxicidad, hipertensi3n y diabetes. Otros efectos secundarios descritos con menor frecuencia son: el prurito, alopecia, hiperpotasemia y trastornos digestivos.

TAC se puede encontrar en varias formulaciones distintas siendo dos de ellas, Prograf® y Advagraf®, que se distinguen en su posolog3a. Prograf® requiere dos ingestas diarias mientras que el Advagraf® requiere una ingesta diaria ya que es una formulaci3n de liberaci3n lenta. Son dos medicamentos producidos por el mismo laboratorio farmac3utico, Astellas Farma®, ambos aprobados para el uso en adultos pero en ni1os s3lo se encuentra aprobado el Prograf®, de hecho, el Advagraf® no est3 recomendado para uso en menores de 18 a1os debido a la escasez de datos sobre seguridad y/o eficacia, lo que hace de extrema importancia la realizaci3n de estudios de seguimiento de pacientes menores de 18 a1os trasplantados cuyo tratamiento haya sido convertido de Prograf® a Advagraf®. Advagraf® se introdujo al mercado con la intenci3n de mejorar la adherencia al tratamiento. Seg3n recientes estudios la tasa de conversi3n entre un f3rmaco y otro es de 1/1 en adultos, es decir que la dosis diaria necesaria de Prograf® es la misma que el mismo paciente requerir3 de Advagraf® (22, 23). Tambi3n se han publicado art3culos en los que en los primeros d3as post conversi3n de Prograf® a Advagraf® el ABC (3rea Bajo la Curva) total era inferior en cerca de 30% (24), lo que llev3 a que algunos autores recomendasen el aumento de la dosis de Advagraf® en los

primeros días o hasta primeros meses post trasplante (25). Debido a la gran variabilidad de resultados farmacocinéticos encontrados en la bibliografía cuando se procede a la transferencia de un fármaco para el otro se requieren más estudios principalmente en población pediátrica.

2.2.1. Farmacocinética

El TAC es eliminado del organismo después de sufrir un extenso metabolismo, siendo este dependiente de la edad, ya que el desarrollo fisiológico produce muchas de las alteraciones relacionadas con la absorción, distribución, metabolismo y excreción, lo que resulta en una alteración de la PK y en la dosis requerida (26). El rango terapéutico del TAC no ha sido definido claramente, pero algunos investigadores lo establecen entre 5 y 20 ng/ml mientras otros establecen que sería más apropiado un rango entre 5 y 15 ng/ml (27, 28). El rango de TAC es diferente según el momento post-trasplante y en los últimos años se han realizado estudios tratando de disminuir lo más posible las concentraciones diana en pacientes estables. Lo que si se ha definido es la necesidad de monitorizar las concentraciones en sangre de este fármaco debido a su estrecho margen terapéutico. La mayoría de los efectos adversos y la mayoría de los rechazos de órganos en pacientes tomando TAC se pueden relacionar al menos en parte con la disposición del fármaco en sangre (29). Actualmente la monitorización terapéutica de TAC se realiza determinando la concentración previa a la dosis (nivel valle), pero se ha demostrado que existe una baja relación entre esta concentración y la exposición total al fármaco representada por el ABC de este fármaco.

Existe una relación muy baja entre la dosis de TAC y las concentraciones en sangre (30), existiendo además una gran variabilidad en la biodisponibilidad oral, que se encuentra alrededor del 17% en pacientes trasplantados de ri n n (27). Además el TAC presenta variación de los niveles en sangre a lo largo del día ya que este fármaco, según algunos autores, presenta una variabilidad circadiana importante debido a las características del primer paso hepático (31), aunque no todos los estudios realizados corroboren estos datos (32). Así, los valores de concentración máxima y del ABC de

concentraciones después de la dosis de la mañana son significativamente mayores que los valores registrados después de la dosis de la tarde/noche (33). Este fármaco presenta también una gran variabilidad interindividual a largo plazo por factores como el cumplimiento terapéutico o interacciones farmacológicas, muchas variantes clínicas como los niveles en suero de albumina, hematocrito y hemoglobina, tiempo transcurrido desde el trasplante, así como de factores genéticos (34-37). La predicción del ABC utilizando C_{min} tampoco es muy adecuada, ya que los resultados obtenidos presentan un margen de error muy amplio (29), debido a esta mala predicción del ABC basada en la C_{min} se han propuesto diversas alternativas para una mejor predicción de la exposición a TAC, incluyendo sistemas bayesianos basados en modelos cinéticos poblacionales y la utilización de técnicas de muestreo abreviado para la predicción más precisa del ABC (32, 38). Las dos formulaciones de TAC presentan una exposición total similar pero sus perfiles farmacocinético son distintos por lo hace el estudio farmacocinético del TAC después de la ingesta de Advagraf muy necesario. El desarrollo de LSSs que puedan predecir la exposición al fármaco son consideradas relevantes en pacientes adultos por ello podrían ser de mayor importancia aun en población pediátrica ya que se estima que su cumplimiento terapéutico es hasta 4 veces inferior que en adultos.

2.2.2. Farmacogenética

TAC presenta un extenso metabolismo hepático mediado por el citocromo P450, y su biodisponibilidad est  también influenciada por ser sustrato del sistema de enzimas transportadoras (MDR1 o ABCB1) (39,40). Este extenso metabolismo hepático hace que su farmacocinética, en el caso de pacientes trasplantados de hígado, se vea afectada principalmente por los marcadores genéticos del donante y no del receptor. La presencia de SNPs del gen *CYP3A5* explican entre el 40 y el 50% de la variabilidad de la dosis de TAC. En particular el rs776746 SNP (c.219-237 A>G), también conocido como alelo *CYP3A5*3*, es un indicador consistente de los requisitos de dosis del TAC. Portadores homocigóticos del alelo de este SNP (*CYP3A5*3/*3*) presentan actividad alterada de la proteína en contraste con los portadores de *CYP3A5*1*, que presentan

actividad proteica normal. Esta actividad normal conlleva que estos pacientes tengan una tasa metab3lica mayor y menores concentraciones de TAC en sangre que los dem3s pacientes (37,41). Se piensa que el *ABCB1* es el responsable de la baja biodisponibilidad oral del TAC y que tambi3n est3 relacionado con la distribuci3n de TAC por el organismo y con su excreci3n (42-44). Sin embargo, la asociaci3n entre los genotipos de *ABCB1* y la farmacocin3tica del TAC siguen sin estar clara. Algunos autores no encuentran relaci3n entre las diferentes concentraciones de TAC y los diferentes genotipos del *ABCB1* (45-47), mientras que otros encuentran diferencias significativas entre los pacientes con diferentes genotipos del *ABCB1* (43,48). Hasta el momento, los polimorfismos m3s estudiados que afectan a la expresi3n de glicoprote3na-P en el tejido humano es una mutaci3n silenciosa en la posici3n 26 del gen (c.3435 T>C rs1045642 SNP) (33). El genotipo CC se ha relacionado con una mayor expresi3n de glicoprote3na-P en el intestino delgado en comparaci3n con el genotipo TT (50). Se ha observado tambi3n que polimorfismos en la oxirreductasa P450 (*POR*) modulan la actividad de enzimas del grupo P450 como las *CYP1A2*, *CYP2C19* y *CYP3A* (51,52). La enzima *POR* parece ser esencial en la oxidaci3n de f3rmacos mediada por *CYP* al donar electrones a las reacciones. Este polimorfismo es altamente polim3rfico, existiendo m3s de 100 SNPs identificados y conectados con la actividad *CYP*. El rs1057868 (c.1508 C>T, *POR**28) es la variante m3s com3n de este gen y se ha relacionado con la reducci3n de la actividad proteica *in vitro* (51). Portadores homocigotos (TT) requieren dosis superiores de TAC para mantener una exposici3n al f3rmaco similar a los pacientes con el genotipo "nativo" (*POR**1/*1) (52). Se encontr3 tambi3n una asociaci3n entre el *POR* rs2868177 y la actividad de *CYP*, que est3 fuertemente relacionada con las dosis de mantenimiento de warfarina (54), aunque esta relaci3n, hasta el momento, no se ha demostrado con la exposici3n de TAC.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

1. La conversión de una dosis estable de Prograf a Advagraf permitirá que los pacientes pediátricos trasplantados de riñón o hígado se mantengan con concentraciones estables de TAC y se mantengan clínicamente estables.
2. La creación de un modelo abreviado de predicción de la exposición al TAC que incluya las concentraciones sanguíneas de fármaco en un corto periodo de tiempo, permitirá predecir la exposición total al TAC sin la necesidad de permanecer en el hospital 24 horas y sin la necesidad de hacer más de 4 extracciones sanguíneas
3. Determinar la frecuencia de los genes CYP3A5*3 c.6986A>G (rs776746), ABCB1 c.3435 C>T (rs1045642) y POR c.1508C>T (rs1057868) y c.188+6405A>G (rs2868177) en la población en estudio y si esta sigue una distribución normal. Existe relación entre los diferentes genotipos y los parámetros farmacocinéticos del TAC.
4. El desarrollo de un modelo explicativo utilizando variables clínicas y genéticas permitirá aclarar un poco más la variabilidad cinética que existente en pacientes pediátricos con trasplante renal o hepático.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

1. Analizar la adecuaci3n de la sustituci3n de Prograf por Advagraf en pacientes pedi3tricos trasplantados de h3gado o ri3n3n mediante dos ensayos cl3nicos, tanto a corto plazo como tras un a3o de seguimiento.
2. Desarrollar estrategias de muestreo abreviado de TAC en los pacientes incluidos en los ensayos cl3nicos que permitan predecir de manera pr3ctica y sencilla la exposici3n a TAC.
3. Describir la frecuencia de aparici3n en los pacientes trasplantados de h3gado o ri3n3n de los polimorfismos de los genes CYP3A5*3 c.6986A>G (rs776746), ABCB1 c.3435 C>T (rs1045642) y POR c.1508C>T (rs1057868) y c.188+6405A>G (rs2868177).
4. Evaluar la repercusi3n del polimorfismo de estos genes de forma individual o formando haplotipos, sobre los par3metros farmacocin3ticos del TAC en pacientes pedi3tricos con trasplante renal
5. Comprobar si los genotipos estudiados pueden explicar el comportamiento farmacocin3tico del TAC en los individuos trasplantados de ri3n3n.

PACIENTES Y MÉTODOS

5. PACIENTES Y MÉTODOS

Todos los materiales y métodos utilizados en este proyecto se detallarán, en los apartados correspondientes de cada uno de los capítulos de resultados. Los dos ensayos clínicos incluidos en esta memoria de proyecto de tesis doctoral han sido aprobados por el Comité Etico de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Todos los pacientes incluidos han sido informados y han firmado el consentimiento informado previo a participar en los respectivos ensayos. Los protocolos de los ensayos clínicos han sido además aprobados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), como se detallar en el apartado correspondiente.

Ambos ensayos clínicos se encuentran registrados en el registro europeo de ensayos clínicos bajo los números de registro:

- Eudra CT 2008-001440-39 “Estudio clínico intrapaciente de biodisponibilidad relativa de dos formulaciones de Tacrolimus: Prograf (comprimidos de liberación normal) y Advagraf (comprimidos de liberación sostenida) en adolescentes (12-18 años) trasplantados de hígado” siendo el promotor de este estudio la Asociación de Investigación Hepatolgica y Transplante Hepático Infantil. Fecha de inicio del ensayo Mayo de 2008.
- Eudra CT 2009-017600-89 “Ensayo intrapaciente de biodisponibilidad relativa de dos formulaciones de Tacrolimus: Prograf (comprimidos de liberación normal) y Advagraf (comprimidos de liberación sostenida) en niños trasplantados de rinn” siendo el promotor de este estudio la Asociación para la Investigación de Nefrología Infantil. Fecha de inicio del ensayo Junio de 2010.

Este proyecto ha dado lugar a 4 publicaciones que dan respuesta a los 5 objetivos generales planteados.

5.1. Artículos publicados

1. **TÍTULO:** Conversion from Prograf to Advagraf in adolescents with stable liver transplants: comparative pharmacokinetics and 1-year follow-up.

AUTORES: Antonio J. Carcas Sansuán, Loreto Hierro, Gonçalo Nuno Almeida-Paulo, Esteban Frauca, Hoi Yang Tong, Carmen Díaz, Enrique Pi ana, Jesús Frías Iniesta y Paloma Jara.

REVISTA: Liver Transplantation, Factor de Impacto (JCR 2013): 3.470 (Q1)

CITA: Carcas-Sansuán AJ, Hierro L, Almeida-Paulo GN, Frauca E, Tong HY, Díaz C, Pi ana E, Frías-Iniesta J, Jara P. Conversion from Prograf to Advagraf in adolescents with stable liver transplants: comparative pharmacokinetics and 1-year follow-up. Liver Transpl. 2013 Oct;19(10):1151-8. doi: 10.1002/lt.23711. PubMed PMID: 23894093.

2. **TÍTULO:** Conversion from Prograf to Advagraf in stable paediatric renal transplant patients and 1-year follow-up.

AUTORES: Ant nio J. Carcas Sansuán, Laura Espinosa Román, Gonçalo Nuno Almeida Paulo, Angel Alonso Melgar, Carmen García Meseguer, Carlota Fernández Cambor, Nicolas Medrano y Elena Ramirez

REVISTA: Pediatric Nephrology, Factor de Impacto (JCR 2014): 2.856 (Q1)

CITA: Carcas-Sansuán AJ, Espinosa-Román L, Almeida-Paulo GN, Alonso-Melgar A, García-Meseguer C, Fernández-Cambor C, Medrano N, Ramirez E. Conversion from Prograf to Advagraf in stable paediatric renal transplant patients and 1-year follow-up. Pediatr Nephrol. 2014 Jan;29(1):117-23. doi: 10.1007/s00467-013-2564-y. PubMed PMID: 23907143.

3. **TÍTULO:** Limited sampling strategies for tacrolimus exposure (AUC0-24) prediction after Prograf(®) and Advagraf(®) administration in children and adolescents with liver or kidney transplants.

AUTORES: Gonçalo Nuno Almeida Paulo, Rubin Lubomirov, Nazareth Laura Alonso Sanchez, Laura Espinosa Román, Carlota Fernández Cambor, Carmen Díaz, Gema Muñoz Barlota y António Jesús Carcas Sansuán

REVISTA: Transplant International, Factor de Impacto (JCR 2014): 2.594 (Q2)

CITA: Almeida-Paulo GN, Lubomirov R, Alonso-Sanchez NL, Espinosa-Román L, Fernández Cambor C, Díaz C, Muñoz Bartola G, Carcas-Sansuán AJ. Limited sampling strategies for tacrolimus exposure (AUC0-24) prediction after Prograf(®) and Advagraf(®) administration in children and adolescents with liver or kidney transplants. Transpl Int. 2014 Sep;27(9):939-48. doi: 10.1111/tri.12362. PubMed PMID: 24861353.

4. **TÍTULO:** Weight of ABCB1 and POR genes on oral tacrolimus exposure in CYP3A5 nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant.

AUTORES: Gonçalo Nuno Almeida Paulo, Irene Dapía García, Rubin Lubomirov, Alberto M. Borobia, Nazareth Laura Alonso Sanchez, Laura Espinosa y António Jesús Carcas Sansuán

REVISTA: Pharmacogenomics Journal, Factor de Impacto no disponible del año 2017, es una revista que pertenece al grupo “Nature Publishing Group”, último factor de impacto conocido es de 3.784 (Q1)

CITA: Almeida-Paulo GN, Dapía García I, Lubomirov R, Borobia AM, Alonso-Sánchez NL, Espinosa L, Carcas-Sansuán AJ. Weight of ABCB1 and POR genes on oral tacrolimus exposure in CYP3A5 nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant. Pharmacogenomics J. 2017 Jan 17. doi: 10.1038/tpj.2016.93. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28094348.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Conversi3n de Prograf a Advagraf en pacientes trasplantados de h3gado y seguimiento de 1 a3o tras la conversi3n.

“Conversion from Prograf to Advagraf in adolescents with stable liver transplants: comparative pharmacokinetics and 1-year follow-up.”

Ant3nio Javier Carcas Sansu3n, Loreto Hierro, **Gonçalo Nuno Almeida-Paulo**, Esteban Frauca, Hoi Yang Tong, Carmen D3az, Enrique Pi3ana, Jes3s Fr3as Iniesta y Paloma Jara.

Liver Transpl. 2013 Oct; 19(10):1151-8. doi: 10.1002/lt.23711.

PubMed PMID: 23894093.

- Este trabajo por s3 mismo responde a la parte correspondiente a los pacientes trasplantados de h3gado del objetivo 1 y 3.

INTRODUCCI3N

En la actualidad existen pocos datos que permitan comparar a farmacocin3tica de Prograf con la de Advagraf en poblaci3n pedi3trica y que permitan conocer la evoluci3n de los pacientes que son convertidos de una formulaci3n a la otra, por lo que, el **objetivo** de este estudio fue el de evaluar la biodisponibilidad del TAC de las dos formulaciones de TAC (Prograf y Advagraf) en pacientes pedi3tricos de entre 12 y 18 a3os trasplantados de h3gado y analizar su evoluci3n al a3o de la conversi3n de Prograf a Advagraf.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio unicentrico, abierto, de conversión de Prograf a Advagraf en el que se han incluido pacientes entre 12 y 18 años de la consulta de trasplante hepático infantil del Hospital Universitario La Paz. Este estudio se diseño para evaluar la biodisponibilidad de TAC tras la conversión de una formulación a la otra y evaluar las diferencias cinéticas y clínicas un año después de la conversión.

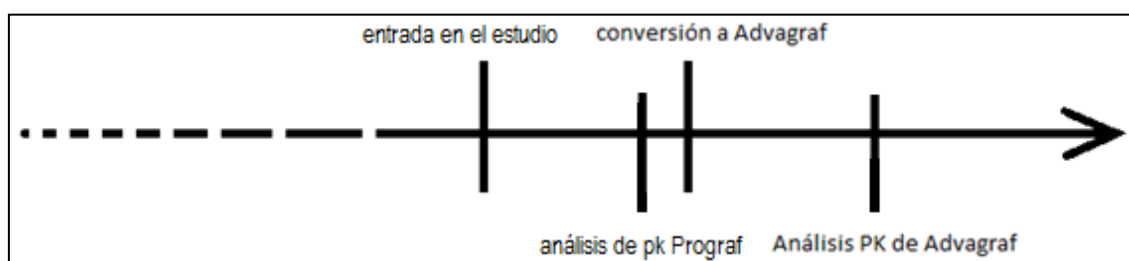


Figura 1. Diseño simplificado del estudio de conversión de Prograf a Advagraf en pacientes adolescentes trasplantados de hígado.

El protocolo del estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario La Paz de Madrid y por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Este estudio se encuentra registrado en el registro europeo de ensayos clínicos (CT-2008-001440-39).

Pacientes y recogida de datos

En este estudio se han incluido 20 pacientes trasplantados de hígado. El tamaño muestral fue calculado a partir de los datos de un estudio de conversión similar descrito en el European Public Assessment Report de Advagraf (code 02-0-131), que estudi la conversión en pacientes adultos trasplantados de corazón y rinn (55). El ABC_{0-24} del Advagraf y del Prograf, en una fase estable del tratamiento, fue de $200,7 \pm 57,5$ y $206,6 \pm 58,4$ ng/ml/h respectivamente. Para una diferencia entre

formulaciones de 5%, un poder del 80% y un intervalo de confianza del 90% el número de pacientes necesario sería de 18. Utilizando como referencia este estudio y teniendo en cuenta posibles pérdidas de seguimiento se calculó que el tamaño muestral debería de ser de 20 pacientes.

Los criterios de inclusión establecidos para este estudio fueron los siguientes:

- Pacientes con edad inferior a 18 años
- Principal inmunosupresor fuera el TAC
- Pacientes con dosis estable de TAC en los 2 últimos controles (variación en la dosis inferior a 20%)
- Pacientes sin cambios en la medicación concomitante que pudiera cambiar los parámetros farmacocinéticos del TAC en los últimos 15 días.
- Pacientes cuyos padres y/o cuidadores se responsabilizaran de la correcta toma de los fármacos.
- Pacientes con función hepática normal caracterizada por:
 - Niveles de AST = 29 ± 7 U/L
 - Niveles de ALT = 25 ± 10 U/L
 - Nivel de bilirrubina total = $0,5 \pm 0,2$ mg/dL

El nico criterio de exclusión fue que no se podrían incluir pacientes que hubieran tenido un episodio de rechazo en los 90 días anteriores a la inclusión en el estudio.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les extrajo una muestra de sangre para la determinación de las variables genéticas de CYP3A5 rs776746, ABCB1 rs1045642, y 2 POR rs1057868 y rs2868177 tras haber firmado el consentimiento informado. Se recogieron también de cada uno de los pacientes variables clínicas como dosis de TAC, medicación concomitante, peso, talla, etc. y demográficas como la edad, el sexo, etc. Todos los pacientes incluidos en el estudio se mantuvieron con su dosis normal de Prograf durante 7 días tras los cuales han sido hospitalizados durante 24 horas para muestreo farmacocinético tomando su dosis normal de Prograf. Al terminar esas 24 horas se han convertido a la otra formulación de TAC (Advagraf) continuando

con la misma dosis diaria. Una semana más tarde los pacientes han sido hospitalizados de nuevo para hacer un muestreo farmacocinético de 24 horas.

Los tiempos de extracci3n de muestras de sangre durante las hospitalizaciones fueron los siguientes:

- Despu3s de 1 semana con dosis estable de Prograf – 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 12,5; 13; 14; 15; 16; 18; 20 y 24 horas.
- Despu3s de 1 semana con Advagraf – 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12; 15 y 24 horas.

Las muestras de sangre extra3das se almacenaron en tubos EDTA y fueron guardadas a -20°C tras la extracci3n.

Determinaciones genéticas

Para la determinaci3n genética se aisl3 el DNA usando QuickGene DNA Whole Blood Kit S, Fujifilm Life Science, Singapore), y fue amplificado por la reacci3n de la cadena de polimerasa con el Applied Biosystems 7900HT fast real-time polymerase chain reaction system (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del producto. Los números de los ensayos para el genotipado de Applied Biosystems fueron los siguientes:

- C__26201809_30 para rs776746
- C__7586657_20 para rs1045642
- C__8890131_30 para rs1057868
- C__11213971_10 para rs2868177

Las amplificaciones se han realizado en una cubeta de 384 pocillos.

Determinaciones farmacocinéticas

El análisis farmacocinético de las concentraciones sangu3neas de TAC se ha realizado siguiendo un modelo no compartimental. El ABC_{0-24} se calcul3 siguiendo la regla trapezoidal y el Cl/F_{oral} (aparente) del fármaco se calcul3 por la dosis dividida por

el ABC₀₋₂₄. Las concentraciones a las diferentes horas se han obtenido del análisis directo de las concentraciones en sangre a esas horas utilizando un inmunoensayo enzimático homogéneo (DIMENSION®, Siemens Health Care Diagnosis Ltd., Frimley, Camberley, UK). Las fluctuaciones en porcentaje se han calculado siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Fluctuación} = \frac{(C_{\text{max}} - C_{\text{a la hora requerida}})}{C_{\text{a la hora requerida}}}$$

La fluctuación se calculó en los intervalos de 0 a 12 horas, de 12 a 24 horas (para Prograf) y de 0 a 24 horas (para Advagraf) utilizando en el caso del Prograf la C_{max} correspondiente en cada una de las dos dosis: mañana y tarde.

Para comparar los parámetros farmacocinéticos se ha utilizado un análisis de varianza y se calculó el intervalo de confianza al 90%. Los cálculos se han hecho después de una transformación logarítmica en IBM SPSS Statistics 19. El estudio de bioequivalencia entre las dos formulaciones se realizó en WinNonlin 2.0 (Pharsight Corp., Cary, NC). Las diferencias encontradas entre las concentraciones a diferentes horas y entre las fluctuaciones fueron determinadas por el test t.

Seguimiento a 1 año

Una vez terminado el estudio farmacocinético los pacientes han continuado con el tratamiento de Advagraf y han sido seguidos en el centro siguiendo la práctica clínica habitual. Los diferentes valores analíticos se han obtenido de las visitas de los pacientes más cercanas a los días 30, 90, 180 y 360 después de la conversión y se han obtenido del sistema electrónico del Hospital Universitario La Paz de Madrid. También se han revisado todos los eventos clínicos relevantes incluyendo posibles episodio de rechazo del órgano. Los valores de creatinina, cistatina C, ALT, AST, bilirrubina y hemoglobina se han determinado al inicio del estudio y se han comparado en cada una de las 4 determinaciones posteriores por el test de Wilcoxon con corrección del error

alfa para comparaciones múltiples según el método de Bonferroni (el error alpha final se estableció en 0,0125)

RESULTADOS

Se han incluido 20 pacientes en el estudio cuyo resumen de sus características demográficas se pueden ver en la tabla 3. Todos han completado el estudio farmacocinético como determinaba el protocolo. No ocurrieron alteraciones analíticas clínicamente significativas. Dos pacientes (1 con cada una de las formulaciones) han tenido diarrea auto limitada durante el tiempo en que permanecieron en el hospital. Se ha podido hacer seguimiento al año de todos los pacientes.

Se ha registrado la medicación concomitante de todos los pacientes que han participado en el estudio: 19 pacientes estaban recibiendo prednisolona con una dosis media de 4mg diarios, 4 pacientes estaban recibiendo micofenolato de mofetilo con un rango de dosis de 11,5 a 25 mg/kg/dia. Otros fármacos que estaban recibiendo eran: clotrimazol (18 pacientes), tediprima (1 paciente), magnesio (10 pacientes), ácido ursodesoxicolico (3 pacientes), valganciclovir (2 pacientes) y omeprazol (2 pacientes). No se ha cambiado ninguna medicación concomitante ni la dosis durante el estudio farmacocinético.

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos.

(n=20)	
Sexo (%)	
Hombre/Mujer	45/55
Raza (%)	
Caucásica/Negro/Hispano	85/5/10
Edad media \pm SD (rango) años	13,9 \pm 1,66 (12-17)
Peso: media (rango)	47,9 (29,4-67,5)
Altura: media (rango)	155,1 (139-169)
Motivo que originó el trasplante (n)	
Atresia biliar	9
Deficiencia de α 1AT	3
Síndrome de Budd Chiari	1
Fallo hepático agudo	3
Fibrosis cística	1
Síndrome Alagille	1
Deficiencia de BSEP	1
MSUD	1
Tipo de trasplante (n)	
Hígado completo de donante cadáver	10
Parte de un hígado de donante cadáver	1
Porción de hígado	9
Reconstrucción biliar	
Roux en Y loop	17
End-to-end	3
Dosis diaria de Prograf al inicio (mg)	
Media \pm SD	4,8 \pm 1,70
Mediana (rango)	4,50 (3-10)
Tiempo transcurrido desde el trasplante (años)	
Mediana	11,70
Rango	1,4-15,5

Determinaciones farmacocinéticas

La figura 2 presenta los resultados de las concentraciones medias de TAC después de la toma de Prograf y Advagraf. Los principales valores farmacocinéticos que representan la disponibilidad de TAC han sido similares en ambas formulaciones como se puede ver en la tabla 4.

Al analizar más detenidamente los valores de concentraciones medias presentados en la figura 2 podemos observar que con la primera ingesta diaria de Prograf se alcanza una C_{max} más alta que con la segunda siendo estas significativamente diferentes entre ellas ($18,87 \pm 5,96\text{ng/mL}$ por la mañana y $13,19 \pm 3,89\text{ng/mL}$ por la tarde). Estas diferencias manifiestan la influencia del ritmo circadiano en la disposición de TAC. Esta C_{max} más alta en la primera ingesta de Prograf se registró

en todos los pacientes con excepci3n de 2 de ellos. Las concentraciones a tiempo 0, 12 y 24 son bastante similares como ser3a de esperar dado que los pacientes se encuentran con un tratamiento estable de TAC.

No se han encontrado diferencias en la $t_{1/2}$ entre la dosis de la mañana y el de la dosis de la tarde como tambi3n fue verificado por Tada et al. (33) (19,46 horas para Prograf y 22,87 horas para el Advagraf) y el T_{max} ha sido el mismo para ambas formulaciones e igual a 1,5 horas.

Los coeficientes de variaci3n interindividual para los principales marcadores de biodisponibilidad han sido tambi3n similares entre las dos formulaciones: 28,20% y 28,50% para C_{max} y para ABC_{0-24} respectivamente para Prograf y 29,10% y 28,80% respectivamente para Advagraf. No se han encontrado diferencias entre hombres y mujeres en estos par3metros cuando los valores se han ajustado por dosis y peso.

Al hacer el estudio estad3stico de bioequivalencia para ABC_{0-24} entre las dos formulaciones encontramos que el intervalo de confianza al 90% para Advagraf/Prograf fue de 90,8 a 112,1. Siendo los datos obtenidos para la C_{max} parecidos a los encontrados para el ABC_{0-24} . Al obtener estos resultados y siguiendo los requisitos establecidos por las agencias regulatorias internacionales podemos considerar las dos formulaciones bioequivalentes.

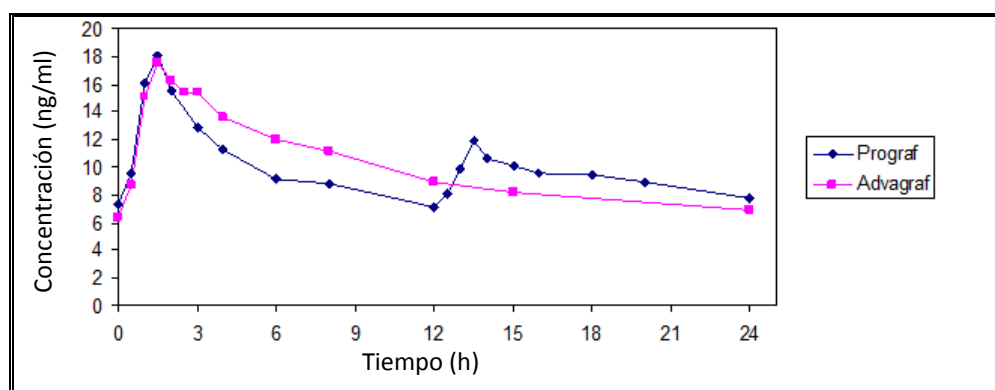


Figura 2. Concentraci3n media de TAC tras la ingesta de cada una de las formulaciones

Tabla 4. Principales parámetros farmacocinéticos de TAC después de la ingesta de Prograf y Advagraf

Parámetro		Prograf	Advagraf	Ratio (90% CI)
C _{max} (ng/mL)		19,52 (5,50)	18,96 (5,52)	96,9 (85,37-110,19)
ABC ₀₋₂₄ (ng/mL*h)		234,86 (66,99)	238,50 (68,76)	100,1 (90,8-112,1)
T _{max} (h)		1,5 (1-13,5)	1,5 (1-4)	
Cl _{oral} (L*h)		21,4 (8,46)	20,77 (7,02)	
C ₀		7,09 (3,97)	7,09 (3,89)	
C12		7,08 (2,38)	8,88 (2,72)*	
C24		7,82 (2,96)	6,81 (2,49)	
Fluctuación	0-12	175,96 (84,90)#	201,48 (124,79)	
	12-24	88,09 (96,20)		
	0-24	173,72 (99,69)		

Los datos se presentan como media y SD para todos los parámetros excepto para T_{max} cuyos datos se presentan como mediana y rango

* p=0,032 para la comparación entre Prograf y Advagraf.

p = 0,004 para la comparación entre 0-12 y 12-24 horas

Determinaciones farmacogenéticas

Como se pude ver en la tabla 5 La frecuencia de cada uno de los genotipos analizados fue la esperada para la población en estudio. El genotipo más frecuente en el citocromo P450 fue el *CYP3A5**3/*3 (0,80), en el ABCB1 fue el CC (0,45), en el POR*28 fue el CC (0,45) y en el POR rs2868177 fue el AG (0,55). En nuestra población no hemos encontrado ningún paciente que expresara *CYP3A5* *1/*1. Al evaluar la distribución de los genotipos de nuestra población podemos decir que sigue el equilibrio de Hardy-Weinberg. No se ha encontrado relación entre los genotipos de los pacientes y los valores farmacocinéticos.

Tabla 5. Frecuencia genotípica de los pacientes para CYP3A5, ABCB1 y los dos POR analizados

Variante	Genotipo	No. (frecuencia)	95% IC
CYP3A5 rs776746	*1/*1	0 (0)	0; 0,2005
	*1/*3	4 (0,2)	0,0661; 0,4427
	*3/*3	16 (0,8)	0,5573; 0,9339
ABCB1 rs1045642	CC	9 (0,45)	0,2383; 0,6795
	CT	7 (0,35)	0,1631; 0,5905
	TT	4 (0,2)	0,0661; 0,4427
POR*28 rs1057868	CC	9 (0,45)	0,2383; 0,6795
	CT	8 (0,4)	0,1998; 0,6359
	TT	3 (0,15)	0,0396; 0,3886
POR rs2868177	AA	7 (0,35)	0,1631; 0,5905
	AG	11 (0,55)	0,3205; 0,7617
	GG	2 (0,1)	0,0175; 0,3313

Seguimiento a 1 año

No se han registrado pérdidas de seguimiento de ninguno de los pacientes que participaron en el estudio inicial de conversión de Prograf a Advagraf. Durante el año de seguimiento no se han registrado problemas de no adherencia y/o episodios de rechazo. Se registró un evento al noveno mes de seguimiento de un paciente que tubo disfunción del injerto debido a trombosis arterial hepática que ocurrió durante un episodio de diarrea severa que curso con deshidratación. Este paciente se recuperó totalmente después de realizada una trombectomia con urokinasa intra-arterial y consiguiente angioplastia. Se registraron también dos casos de infección no complicada por virus influenza A y un caso de fibrosis quística que necesit  ingreso en el hospital por una infección pulmonar. Se han realizado pruebas rutinarias de análisis de virus Epstein-Barr por cuantificación del DNA y se registró un caso que presentaba valores 2 veces superiores a 10^4 copias/mL. No se han registrado desordenes linfoproliferativos.

En la figura 3 se pueden ver los principales valores analíticos comparados en los diferentes tiempos determinados 0, 30, 90, 180 y 360 días después de la conversión. No se han encontrado diferencias significativas en la media de los niveles de las enzimas hepáticas durante el periodo en estudio; 2 pacientes presentaban valores de ALT ligeramente superiores a lo normal, siendo estos el paciente con fibrosis quística y el otro el que sufrió una trombosis arterial hepática. Los niveles de cistatina C y de creatinina en sangre demuestran que no ocurrieron alteraciones significativas a nivel renal (Fig. 3). Las alteraciones registradas en los niveles y dosis de TAC se encuentran registradas en la figura 4. Los niveles de TAC disminuyen significativamente de 6,43 ng/mL antes de la conversión a 4,25 ng/mL a los 90 días y 4,4 ng/mL a los 180 días. A estos tiempos también se registró un incremento del ratio dosis/nivel y del ratio dosis/nivel ajustado por peso. Estos valores volvieron a acercarse a los valores basales a los 360 días. Los valores del ratio de dosis/nivel/peso también han sido evaluados pero eran similares a los valores de dosis/nivel y la distribución era similar también.

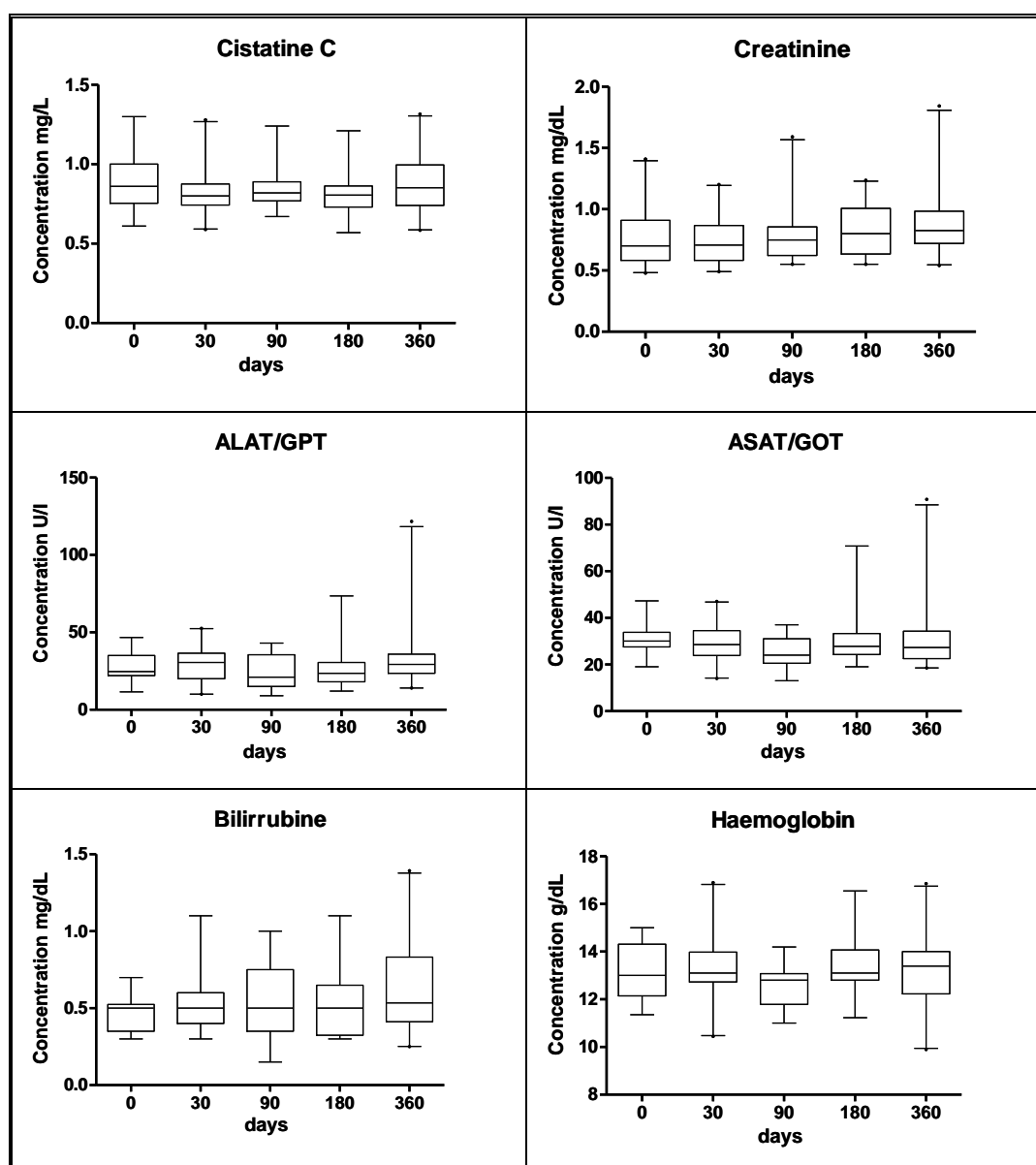


Figura 3. Representaciones de la evoluci3n de los principales par3metros anal3ticos

Los datos se presentan en diagramas de cajas con intervalo al 95% y las l3neas de las cajas representan el 25%, la media y el 75% de la distribuci3n de la muestra.

No se han encontrado diferencias significativas en ninguno de los valores cuando se compararon con los valores iniciales.

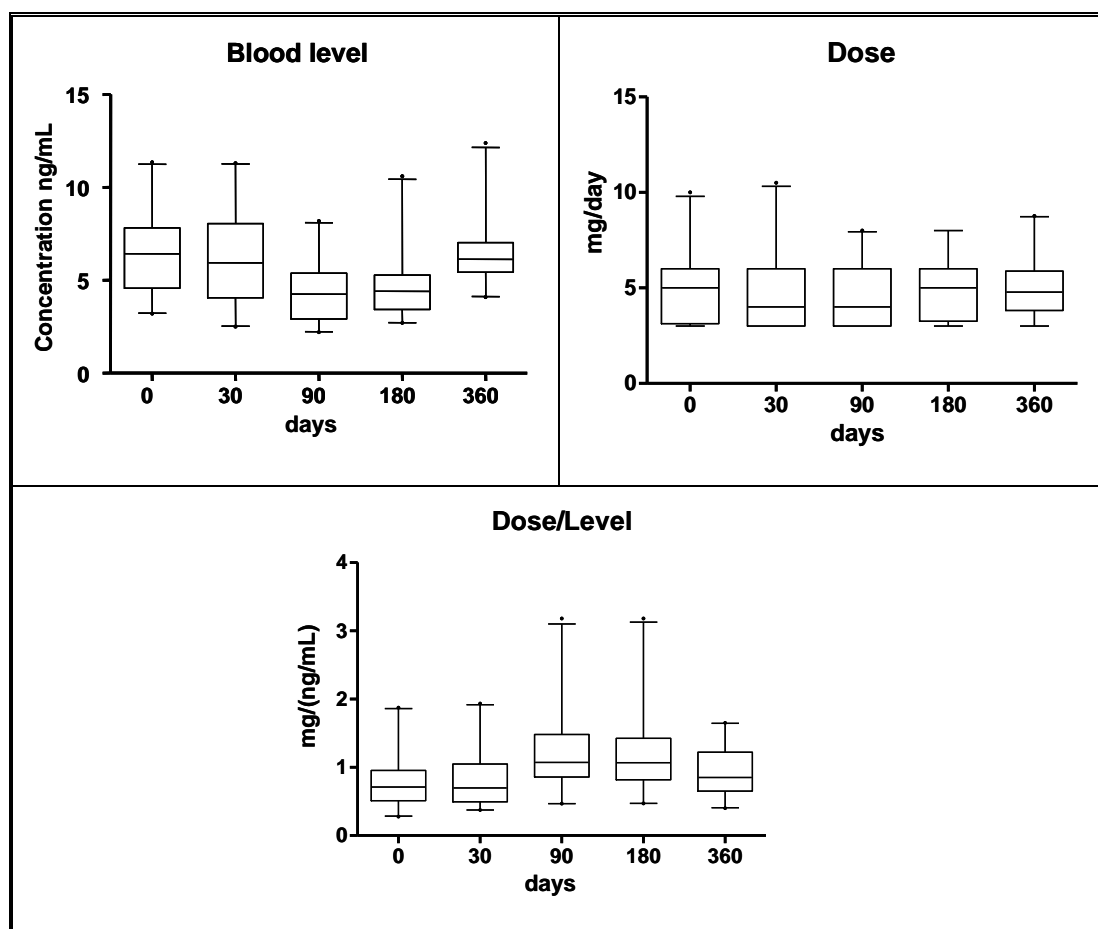


Figura 4. Niveles de TAC en sangre, dosis de TAC y ratio dosis/nivel de TAC durante el año de seguimiento de los pacientes

Los datos se presentan en diagramas de cajas con intervalo al 95% y las líneas de las cajas representan el 25%, la media y el 75% de la distribuci3n de la muestra.

6.2. Conversi3n de Prograf a Advagraf en pacientes trasplantados renales y seguimiento de 1 a1o tras la conversi3n.

“Conversion from Prograf to Advagraf in stable paediatric renal transplant patients and 1-year follow-up. ”

Antonio J. Carcas Sansu3n, Laura Espinosa Rom3n, **Gonçalo Nuno Almeida Paulo**, Angel Alonso Melgar, Carmen Garc3a Meseguer, Carlota Fern3ndez Cambor, Nicolas Medrano y Elena Ramirez

Pediatric Nephrology

PubMed PMID: 23907143

Factor Impacto: 2.856 (Q1)

- Este trabajo por s3 mismo responde a la parte correspondiente a los pacientes trasplantados de ri13n del objetivo 1 y 3.

INTRODUCCI3N

En la actualidad existen pocos datos que permitan comparar a farmacocin3tica de Prograf con la de Advagraf en poblaci3n pedi3trica y que permitan conocer la evoluci3n de los pacientes que son convertidos de una formulaci3n a la otra, por lo que, el **objetivo** de este estudio fue el de evaluar la biodisponibilidad del TAC de las dos formulaciones de TAC (Prograf y Advagraf) en pacientes pedi3tricos trasplantados de ri13n y analizar su evoluci3n al a1o de la conversi3n de Prograf a Advagraf.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio unicentrico, abierto, de la conversión de Prograf a Advagraf en el que se han incluido pacientes menores de 18 años de la consulta de trasplante renal infantil del Hospital Universitario La Paz. Al igual que el estudio anteriormente mencionado este estudio se disen para evaluar la biodisponibilidad de TAC tras la conversión de una formulación a la otra y evaluar las diferencias cinéticas y clínicas un año después de la conversión el diseño simplificado del estudio se puede ver en la figura 1.

El protocolo del estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario La Paz de Madrid y por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Este estudio se encuentra registrado en el registro europeo de ensayos clínicos (CT-2009-017900-89).

Pacientes y recogida de datos

En este estudio se han incluido 21 pacientes trasplantados de rinn, siendo que el tamaño muestral fue calculado a través de un estudio de conversión similar, el European public assessment report for Advagraf (code 02-0-131), que estudi la conversión en pacientes adultos trasplantados de corazón y rinn (54). El ABC_{0-24} del Advagraf y del Prograf en una fase estable del tratamiento fue de $200,7 \pm 57,5$ y $206,6 \pm 58,4$ ng/ml'h respectivamente. Para una diferencia entre formulaciones de 5%, un poder del 80% y un intervalo de confianza del 90% el número de pacientes necesario sería de 18. Utilizando como referencia este estudio y teniendo en cuenta posibles pérdidas de seguimiento hemos establecido que el tamaño muestral debería de ser de 21 pacientes.

Los criterios de inclusión establecidos para este estudio fueron los siguientes:

- Pacientes con edad comprendida entre los 4 y los 18 años.
- Pacientes con capacidad de tragar la medicaci3n.
- Pacientes con dosis estable de TAC en los últimos 30 días, definida como dosis estable una variaci3n inferior a 20% entre dosis y concentraciones en sangre de TAC durante este periodo y la no administraci3n de ningún fármaco que pudiera alterar los parámetros farmacocin3ticos del TAC.
- Decisi3n clínica previa para cambiar del Prograf al Advagraf.
- Capacidad de entender los procedimientos del estudio y las indicaciones del tratamiento.
- Padres y/o cuidadores capaces de controlar la medicaci3n de los pacientes siguiendo las instrucciones dadas.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les extrajo una muestra de sangre para la determinaci3n de las variables gen3ticas *CYP3A5*, *ABCB1*, y *2 POR* tras haber firmado el consentimiento informado aunque en este trabajo no se presenten resultados gen3ticos estos se presentarn en la cuarta publicaci3n de esta tesis. Se han recogido tambi3n de cada uno de los pacientes variables clínicas como dosis de TAC, medicaci3n concomitante, peso, talla, etc. y demográficas como la edad, el sexo, etc. Todos los pacientes incluidos en el estudio se mantuvieron con su dosis normal de Prograf durante 7 días tras los cuales han sido hospitalizados durante 24 horas para muestreo farmacocin3tico tomando su dosis normal de Prograf. Al terminar esas 24 horas se han convertido a la otra formulaci3n de TAC (Advagraf) continuando con la misma dosis diaria. Una semana más tarde los pacientes han sido hospitalizados de nuevo para hacer un muestreo farmacocin3tico de 24 horas.

Los tiempos de extracci3n de muestras de sangre durante las hospitalizaciones fueron los siguientes:

- Despu3s de 1 semana con Prograf – 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 12,5; 13; 14; 15; 16; 18; 20 y 24 horas.
- Despu3s de 1 semana con Advagraf – 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12; 15 y 24 horas.

Las muestras de sangre extraídas se almacenaron en tubos EDTA y fueron guardadas a -20°C tras la extracci3n.

Determinaciones farmacocinéticas

Las determinaciones farmacocinéticas se han hecho siguiendo un modelo no compartimental. ABC_{0-24} se calcul3 siguiendo la regla trapezoidal y el Cl_{oral} del fármaco se calcul3 por la dosis dividida por el ABC_{0-24} . Las concentraciones a las diferentes horas se han obtenido del análisis directo de las concentraciones en sangre a esas horas utilizando un inmunoensayo enzimático homogéneo (DIMENSION®, Siemens Health Care Diagnosis Ltd., Frimley, Camberley, UK). Las fluctuaciones en porcentaje se han calculado siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Fluctuaci3n} = \frac{(C_{\max} - C_{a \text{ la hora requerida}})}{C_{a \text{ la hora requerida}}}$$

La fluctuaci3n se calcul3 en los intervalos de 0 a 12 horas, de 12 a 24 horas y de 0 a 24 horas utilizando en el caso del Prograf la C_{\max} correspondiente en cada uno de los periodos.

Para comparar los parámetros farmacocinéticos se ha utilizado un análisis de varianza y se calcul3 el intervalo de confianza al 90%. Los cálculos se han hecho después de una modificaci3n logarítmica. El análisis estadístico de la farmacocinética se realizó en IBM SPSS Statistics 19 y de la bioequivalencia se realizó en WinNonlin 2.0 (Pharsight Corp., Cary, NC). Las diferencias encontradas entre las concentraciones a diferentes horas y entre las fluctuaciones fueron determinadas por el test *t*.

Seguimiento a 1 ańo

Una vez terminado el estudio farmacocinético los pacientes han continuado con el tratamiento de Advagraf y han sido seguido en el centro siguiendo la prÁctica clínica habitual. Los diferentes valores analíticos se han obtenido de las visitas de los

pacientes más cercanas a los días 30, 90, 180 y 360 después de la conversi3n y se han obtenido del sistema electr3nico del hospital La Paz de Madrid. También se han revisado todos los eventos clínicos relevantes incluyendo posibles episodio de rechazo del 3rgano. Los valores de creatinina, cistatina C, ALT, AST, bilirrubina y hemoglobina se han determinado al inicio del estudio y se han comparado en cada una de las 4 determinaciones posteriores por el test de Wilcoxon siendo que la correcci3n del error alpha por comparaciones múltiples se realiz3 por el m3todo de Bonferroni (el error alpha final se estableci3 en 0,0125)

RESULTADOS

Se han incluido 21 pacientes en el estudio cuyo resumen de sus características demográficas se pueden ver en la tabla 6. Todos los pacientes estaban tomando dos o más fármacos inmunosupresores a parte del TAC. Todos los pacientes estaban tomando micofenolato mofetilo como inmunosupresor complementario al TAC. Catorce pacientes estaban tomando Metilprednisolona y dos tomaban deflazacort. Además de inmunosupresores muchos pacientes tomaban complementos alimenticios.

Durante el estudio de conversi3n de las dos formulaciones no se han registrado alteraciones significativamente relevantes en los valores analíticos de los pacientes. Tampoco se han registrado efectos adversos relacionados con los fármacos, pero un paciente tuvo diarrea auto-limitada y otro paciente contrajo una infecci3n por virus influenza A que fue tratada sintomáticamente con Paracetamol. Ambos casos fueron registrados en los primeros 7 días de ingesta de Advagraf.

Tabla 6. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos.

(n=21)	
Sexo	
Hombre/Mujer (%)	57/43
Raza	
Caucásico/Hispano/Asiático/Árabe (%)	80/5/10/5
Edad media \pm SD (rango), años	12,29 \pm 4,17 (4-17)
Peso medio \pm SD (rango), kg	42,85 \pm 15,42 (15,1-63,8)
Altura media \pm SD (rango), cm	143,4 \pm 18,16 (105-168)
Dosis diaria de Prograf (mg)	
Media \pm SD	4,8 \pm 1,70
Mediana	4,00
Rango	3-10
Tiempo transcurrido desde el trasplante hasta la conversión en años	
Media \pm SD	5,390 \pm 3,25
Median	4,17
Rango	1,4-13,1
Motivo que origino el trasplante	
Desordenes glomerulares	2
Desordenes no glomerulares	19

Los desórdenes no glomerulares incluyen displasia (13 pacientes), hereditarios (5 pacientes) y síndrome sistémico hemolítico (1 paciente)

Determinaciones farmacocinéticas

La figura 5 presenta los resultados de las concentraciones medias de TAC después de la toma de Prograf y Advagraf. Como se puede apreciar las concentraciones Tacrolimus tras la ingesta de Advagraf son bastante más estables que las presentes tras la ingesta de Prograf y la C_{max} es más baja con el Advagraf que con el Prograf. Los principales valores farmacocinéticos que representan la disponibilidad de TAC han sido similares en ambas formulaciones como se puede ver en la tabla 7.

Al analizar más detenidamente los valores de concentraciones medias presentados en la figura 5 podemos observar, que no existe diferencia significativa entre las concentraciones a tiempo 0 y a tiempo 24 horas. Cuando comparamos las concentraciones a las 12 horas se verifica que la concentración de TAC es superior después de la ingesta de Advagraf que después de la ingesta de Prograf este hecho era esperable debido a que el Advagraf es una formulación de liberación lenta de TAC. Las

fluctuaciones entre la C_{max} y la C_{24} han sido similares entre las dos formulaciones ($p=0,741$) pero estas fluctuaciones son significativamente diferentes cuando comparamos las dos dosis de Prograf.

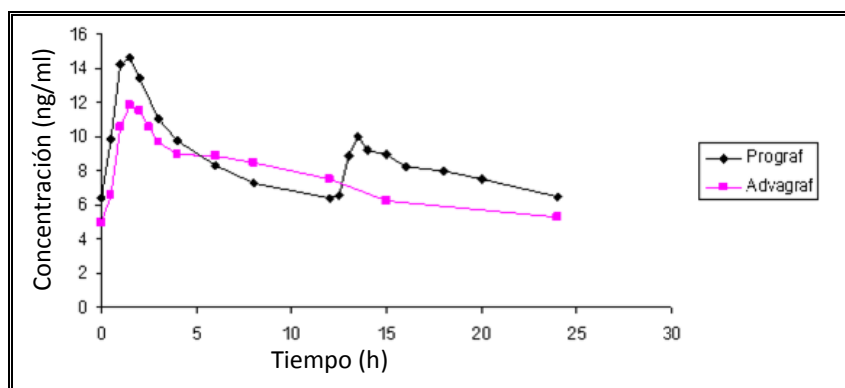


Figura 5. Concentración media de TAC tras la ingesta de cada una de las formulaciones

Tabla 7. Valores de concentración media de TAC tras la ingesta de Prograf o Advagraf a las 0, 12 y 24 horas.

Tiempo (h)	Prograf		Advagraf	
	Media \pm SD		Media \pm SD	
0	6,43 \pm 1,32		4,96 \pm 1,64	
12	6,42 \pm 1,56		7,51 \pm 2,67	
24	6,50 \pm 1,20		5,26 \pm 1,34	
Fluctuación	Media \pm SD	p	Fluctuación	Media \pm SD
Dosis de la mañana 0_12	161,79 \pm 93,71	0,001	0_24	164,98 \pm 94,02
Dosis de la tarde 12_24	76,14 \pm 56,38			
Periodo de 0_24	155,80 \pm 84,79			

Tabla 8. Principales parámetros de disposición del Prograf y del Advagraf y bioequivalencia.

N=21	C_{max}		ABC_{0-24}		T_{max}	
	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf
Media \pm SD	16,45 \pm 5,68	13,63 \pm 5,03	202,30 \pm 39,63	178.23 \pm 42,61	2,57 \pm 3,75	3,80 \pm 3,81
Mediana	15,60	13,80	202,60	177,70	1.50	2.00
rango	9,2-32,2	5,2-26,5	146,8-285,9	106,425-283,4	0,5-15	1-15
Análisis de Bioequivalencia						
	Ratio Advagraf/Prograf	90% CI			poder	
		Límite inferior		Límite superior		
Ln (C_{max})	81,54	71,60		92,87	80,35	
Ln (ABC_{0-24})	87,19	79,91		95,13	98,48	

Seguimiento a 1 año

Se ha registrado la perdida de seguimiento de uno de los pacientes porque 3 meses después de la conversión alcanzó los 18 años de edad y pas  a ser seguido en otro hospital. Los datos de este paciente se han incluido hasta los 3 meses (90 días) de seguimiento para los demás días evaluados solo se han evaluado 20 pacientes.

Después de un año de seguimiento los 20 pacientes se mantienen en una situación clínica estable. Los valores de hemoglobina, albumina y bilirrubina permanecieron estables durante todo el estudio. Como se puede ver en la figura 6, los niveles de cistatina C y creatinina en plasma permanecieron estables sin variaciones clínicamente significativas en la función renal. Los niveles de TAC disminuyeron entre los meses 1 y 6. La dosis fue aumentando a lo largo del tiempo durante el año de seguimiento empezando en el día 90. Dado que muchos de los pacientes incluidos son niños de baja edad est n sujetos a grandes variaciones de peso en cortos periodos de tiempo, también se calculó el ratio entre la dosis y el peso encontrándose una diferencia clínicamente significativa entre los días 90 y 180 pero no al año (Fig. 7). El ratio entre la dosis y la concentración de TAC en sangre fue estadísticamente diferente en los días 30, 90 y 180 pero no al año. Se encontró una tendencia similar cuando este ratio se ajustó por el peso.

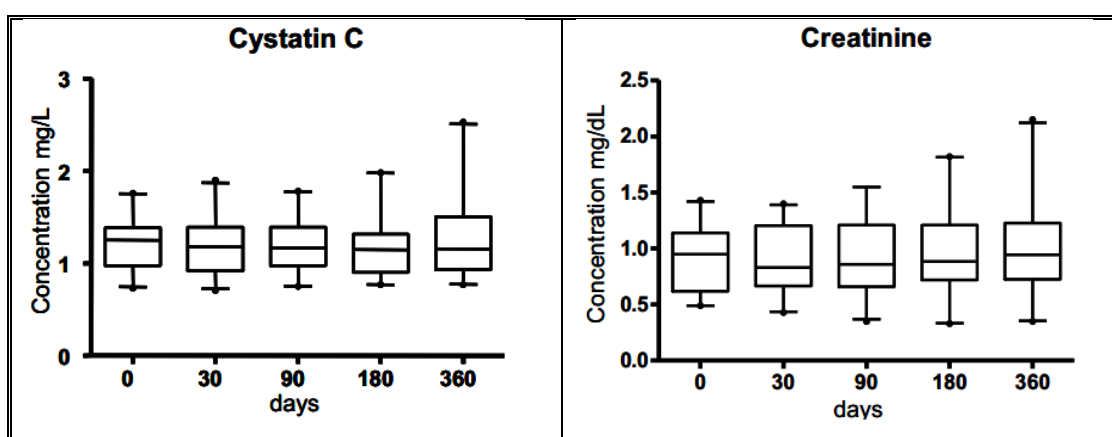


Figura 6. Representaciones de la evolución de los valores de cistatina C y de Creatinina a lo largo de un año de seguimiento

Los datos se presentan en diagramas de cajas con intervalo al 95% y las líneas de las cajas representan el 25%, la media y el 75% de la distribución de la muestra. No se han encontrado diferencias significativas en ninguno de los valores cuando se compararon con los valores iniciales.

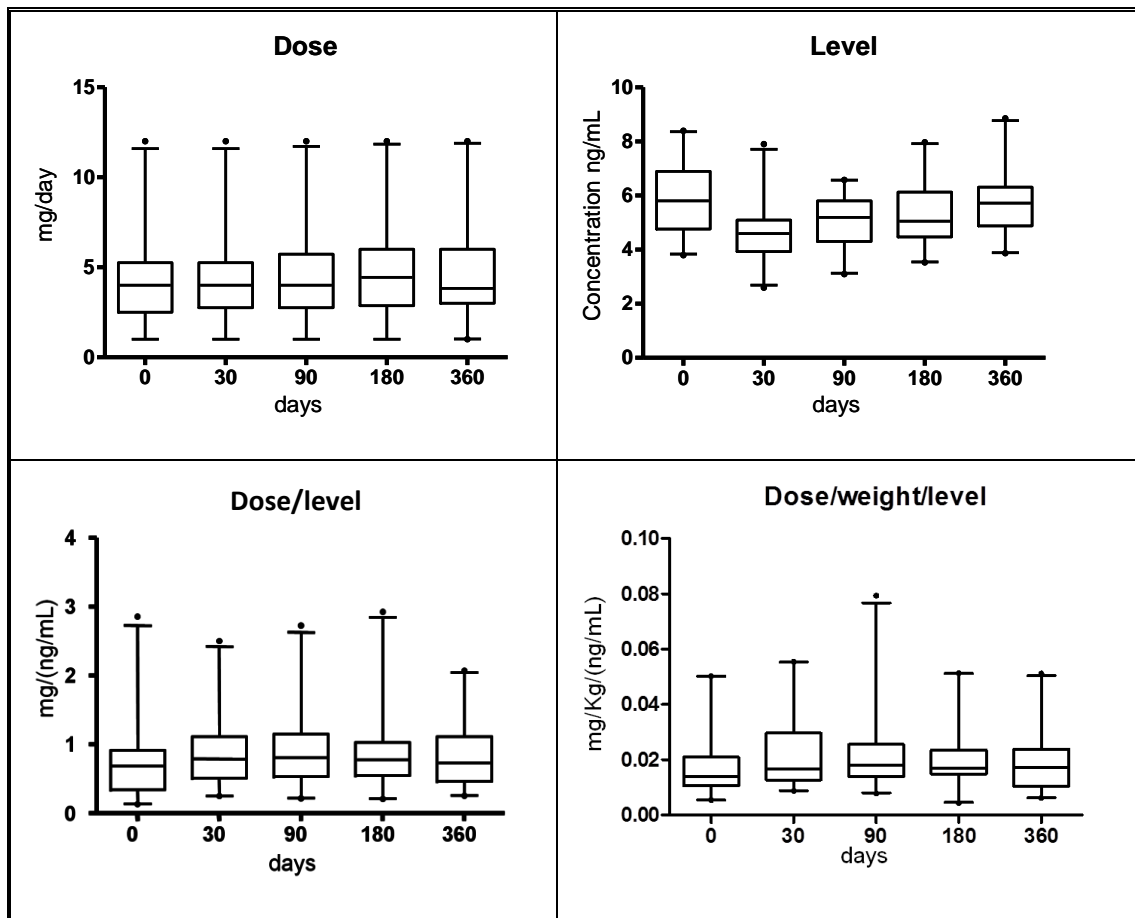


Figura 7. Dosis de Advagraf, nivel de TAC en sangre, ratio dosis/nivel y ratio dosis/nivel ajustado por peso de TAC durante el año de seguimiento de los pacientes

Los datos se presentan en diagramas de cajas con intervalo al 95% y las líneas de las cajas representan el 25%, la media y el 75% de la distribuci3n de la muestra.

6.3. Desarrollo de estrategias de muestreo abreviado LSS

“Limited sampling strategies for tacrolimus exposure (AUC₀₋₂₄) prediction after Prograf(®) and Advagraf(®) administration in children and adolescents with liver or kidney transplants.”

Gonçalo Nuno Almeida Paulo, Rubin Lubomirov, Nazareth Laura Alonso Sanchez, Laura Espinosa Román, Carlota Fernández Cambor, Carmen Díaz, Gema Muñoz Barlota y António J. Carcas Sansuán

Transplant International

PubMed PMID: 24861353.

Factor Impacto 2016: 3.079 (Q1)

- Este trabajo por sí mismo responde al objetivo 2.

INTRODUCCION

Una vez descritas las características farmacocinéticas de las dos formulaciones de TAC, en los dos tipos de trasplante por separado, y al verificar que los resultados no diferían mucho entre ellos, nuestro **objetivo** fue desarrollar estrategias de muestreo abreviado, para poder determinar la exposición total de estos pacientes a los fármacos estudiados, por la determinación de ABC₀₋₂₄. El uso de esquemas abreviados de determinación de ABC₀₋₂₄ permite calcular este parámetro con grande exactitud y reducir el gasto tanto en determinaciones farmacocinéticas, como en personal sanitario reduciendo también las molestias ocasionadas a los pacientes. Aunque, en el desarrollo de estas estrategias siempre tuvimos que tener en cuenta, el estrecho margen terapéutico de este principio activo y el riesgo que conlleva una mala monitorización, especialmente en este tipo de intervenciones que pueden llevar a la pérdida del órgano trasplantado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Los datos utilizados para el análisis en este estudio se han recogido de los dos ensayos clínicos mencionados en los dos artículos anteriores; trasplante hepático (CT-2008-001440-39) y trasplante renal (CT-2009-017900-89). Se han utilizado las concentraciones de TAC previamente determinadas para todos los pacientes y con ambas formulaciones, a las horas determinadas en los protocolos de los estudios clínicos mencionadas y descritas en los apartados 6.1 y 6.2 de esta tesis.

Análisis farmacocinético y análisis estadístico

El análisis cinético fue realizado siguiendo un modelo no-compartimental. ABC_{0-24} fue calculado por la regla trapezoidal. C_{max} se obtuvo directamente de las concentraciones de TAC registradas.

Se utilizó un análisis basado en regresiones lineares para obtener las horas que tenían mayor relación con el ABC_{0-24} para Prograf y para Advagraf. Basándonos en trabajos publicados anteriormente de LSS (56), establecimos los siguientes puntos para desarrollar nuestros modelos: para Prograf C_0 , C_1 , $C_{1,5}$, C_2 , C_3 y C_4 . Para Advagraf los puntos fueron los siguientes: C_0 , C_1 , $C_{1,5}$, C_2 , $C_{2,5}$, C_3 y C_4 . Todos los modelos desarrollados incluyen la concentración de TAC a tiempo 0 y un máximo de 3 concentraciones. La selección de los mejores modelos se hizo basándonos en el r^2 , ME y MAE. El ME refleja el error en las predicciones y el MAE es una estimación de la precisión de la regresión lineal desarrollada. El ME fue calculado como la media de las diferencias entre el ABC_{0-24} predicho y el real y el MAE se calculó como la media de la diferencia absoluta entre el ABC_{0-24} predicho y el real. El MAE% se expresa como el porcentaje del ABC_{0-24} observado. Para todos estos parámetros se calculó la desviación estándar y el intervalo de confianza al 95%. Para cada uno de los grupos primero se seleccionaron 5 LSSs con la mejor r^2 , de esas 5 LSSs se rechazaron aquellas que

presentaban mayores ME, las que tenían un mayor CI al 95% y las que tenían un mayor MAE%.

RESULTADOS

En total para este estudio se ha recogido informaci3n de 41 pacientes (20 provenientes del estudio de conversi3n de Prograf a Advagraf en trasplante hepático y 21 provenientes del estudio de conversi3n de Prograf a Advagraf en trasplante renal). Las características demográficas de los pacientes de cada uno de los estudios se pueden ver en la tabla 3 para los pacientes con trasplante hepático y en la tabla 6 para los pacientes trasplantados de riñ3n que se encuentran en el apartado 6.1 y 6.2 respectivamente de esta tesis.

El principal inmunosupresor de los 41 pacientes era el TAC. Adem1s del TAC la mayoría de los pacientes tomaban otros fármacos:

- Micofenolato de mofetil – 25 pacientes
- Prednisolona – 23 pacientes
- Clotrimazol – 18 pacientes
- Ácido ursodexocólico – 3 pacientes
- Deflazacort – 2 pacientes
- Omeprazol – 2 pacientes
- Valganciclovir – 2 pacientes
- Trimetoprina – 1 paciente

No se han registrado alteraciones en la medicaci3n concomitante de los pacientes durante el estudio farmacocinético.

Disposici3n de TAC tras la ingesta de Prograf o Advagraf

La figura 8 representa la concentraci3n media de TAC en los 41 pacientes

La disposici3n de TAC es bastante similar entre las dos formulaciones en ambos trasplantes registrándose apenas diferencias significativas en el ABC_{0-24} , C_{max} , y T_{max} del

Advagraf cuando se comparan sus valores entre los dos tipos de trasplante pero cuando se ajustan estos valores por dosis y peso estas diferencias desaparecen.

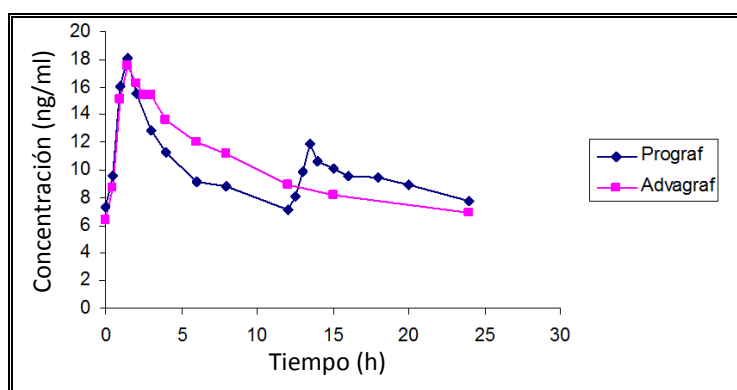


Figura 8. Concentraci3n media de TAC obtenida de los 41 pacientes convertidos de Prograf a Advagraf.

Tabla 9. Par3metros de disposici3n primarios del TAC tras la ingesta de Prograf en ambos trasplantes.

ABC ₀₋₂₄ N=41	Prograf (media \pm SD)			
	Riñ3n	H3gado	P	Global
ABC ₀₋₂₄ (ng·h/ml)	202,03 \pm 42,61	234,92 \pm 68,77	0,063	218,21 \pm 56,45
ABC ₀₋₂₄ ((ng·h/ml)/ng/Kg)	2546,070 \pm 1182,201	2571,980 \pm 907,385	0,370	2558,709 \pm 1044,060
Cl/F (l·h/Kg)	0,48 \pm 0,23	0,46 \pm 0,19	0,775	0,47 \pm 0,21
Cl/F (l·h)	19,81 \pm 11,86	21,35 \pm 6,80	0,615	20,56 \pm 9,64
C _{max} (ng/ml)	16,45 \pm 5,68	19,52 \pm 5,51	0,087	17,95 \pm 5,74
T _{max} (h)	1,5 (1-1,5)	1,5 (1-2)	0,897	1,5 (1-1,5)

Tabla 10. Par3metros de disposici3n primarios del TAC tras la ingesta de Advagraf en ambos trasplantes.

ABC ₀₋₂₄ N=41	Advagraf (media \pm SD)			
	Riñ3n	H3gado	P	Global
ABC ₀₋₂₄ (ng·h/ml)	178,23 \pm 42,61	238,50 \pm 68,77	0,002	207,63 \pm 63,91
ABC ₀₋₂₄ ((ng·h/ml)/ng/Kg)	2248,106 \pm 1043,261	2548,624 \pm 731,623	0,204	2394,700 \pm 906,410
Cl/F (l·h/Kg)	0,56 \pm 0,30	0,45 \pm 0,16	0,128	0,51 \pm 0,25
Cl/F (l·h)	25,16 \pm 19,17	20,78 \pm 7,02	0,342	23,02 \pm 14,56
C _{max} (ng/ml)	13,63 \pm 5,03	18,96 \pm 5,52	0,002	16,23 \pm 5,87
T _{max} (h)	2 (1,5-6)	1,5 (1,5-2)	0,040	1,5 (1,5-3)

Análisis de los modelos de predicción desarrollados

Se han analizado todas las posibles LSS con todas las combinaciones posibles de tiempos de extracción para determinar cuáles eran las que mejores resultados para 1) ambos trasplantes con ambas formulaciones, 2) para ambos trasplantes sin tener en consideración la formulación, 3) para ambas formulaciones sin tener en consideración el 3rgano y 4) sin tener en consideración ni el tipo de trasplante ni el tipo de formulación.

Primero se analizaron todas las LSS por separado. El r^2 para la relación entre C_0 y ABC_{0-24} era bastante bajo (inferior a 0,739); como se puede ver en las tablas 11 a 14, muestra sistemáticamente diferencias significativas en r^2 y MAE% cuando se compara con el mejor LSS desarrollado. Generalmente no se encontraron diferencias significativas entre las 5 mejores LSS debido a los altos valores de r^2 . Sin embargo, algunas LSS presentaban un ME que era sesgado o tenían un IC 95% alto por lo que fueron descartadas; sería el caso de las LSS desarrolladas con las concentraciones a los tiempos 0-1-4 y 0-2-3 después de la ingesta de Prograf en pacientes con trasplante renal. Un proceso similar fue utilizado al evaluar el MAE%, como por ejemplo la LSS desarrollada con las concentraciones a los tiempos 0-1-2,5 y 0-0,5-4 tras la ingesta de Advagraf en trasplante renal; estas dos LSS tenían valores muy similares de r^2 (0,930 versus 0,931) pero presentaban diferencias estadísticamente significativas en MAE% ($7,522 \pm 3,630$ versus $5,100 \pm 3,437$ t -test $p < 0,05$) lo que llevó a seleccionar la LSS $C_{0-0,5-4}$ como la que mejor predice el ABC_{0-24} del Advagraf en trasplante renal.

Primer análisis, utilizando todas las concentraciones divididas por trasplante y por formulación.

La mejor LSS para Prograf en pacientes trasplantados de h3gado es la que usa concentraciones a los tiempos 0; 1,5; 4 horas ($r^2=0,939$). En el caso del ri3n3n, en pacientes tomando Prograf, es la que utiliza extracciones a las 0; 1; 3 horas siendo el $r^2=0,925$. Para el Advagraf se obtuvieron $r^2=0,938$ y $r^2=0,931$ para trasplante hepático y renal respectivamente siendo los puntos de extracción para en el caso trasplante

hepático 0; 1; 2,5 horas y para el trasplante renal 0; 0,5; 4 horas. Las ecuaciones de las 5 mejores LSS en cada uno de estos casos se encuentran en la tabla 11.

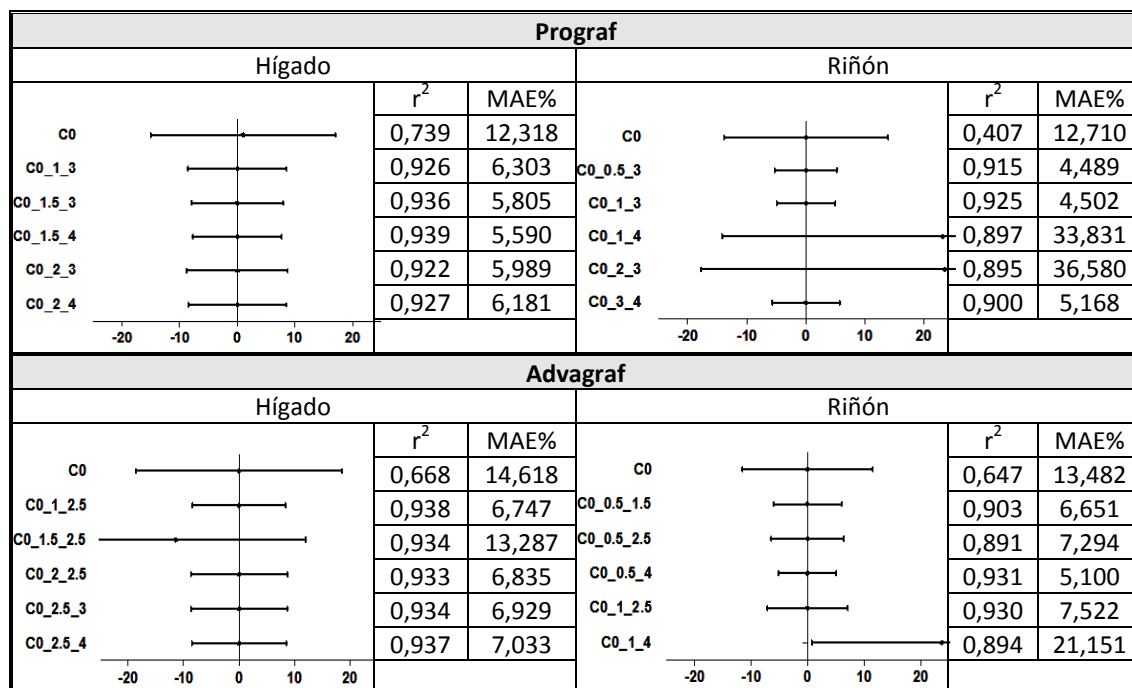


Figura 9. Representación del IC 95%, r^2 y MAE% en la predicción del ABC0-24 de las mejores LSS desarrolladas para Prograf y Advagraf en trasplante hepático y renal

Tabla 11. Presentaci3n de las mejores LSS desarrolladas para Prograf y Advagraf en trasplante hep3tico y renal y de las LSS desarrolladas utilizando solamente como variable la concentraci3n a tiempo 0

Prograf						
Indicadores	H3gado	MAE% (n = 20)				Ecuaciones
	r ²	Media	Min.	M3x.	DS	
C ₀	0,739	12,308	0,690	40,111	8,240	y = 14,483C ₀ + 133,242
C ₀ -C ₁ -C ₃	0,926	6,303	0,234	20,581	3,678	y = 4,503C ₀ + 1,483C ₁ + 9,119C ₃ + 61,691
C ₀ -C _{1,5} -C ₃	0,936	5,805	0,312	18,612	3,577	y = 4,908C ₀ + 2,638C _{1,5} + 7,249C ₃ +59,054
C ₀ -C _{1,5} -C ₄	0,939	5,590	0,127	18,113	3,426	y = 4,669C ₀ + 3,597C _{1,5} + 8,748C ₄ +38,578
C ₀ -C ₂ -C ₃	0,922	5,989	0,056	19,089	4,321	y = 5,076C ₀ + 2,323C ₂ + 7,246C ₃ + 69,449
C ₀ -C ₂ -C ₄	0,927	6,181	0,128	21,199	3,516	y = 4,933C ₀ + 3,841C ₂ + 7,880C ₄ + 51,707
Indicadores	Riñ3n	MAE% (n = 21)				Ecuaciones
	r ²	Media	Min.	M3x.	DS	
C ₀	0,407	12,710	0,018	28,849	5,427	y = 19,129C ₀ + 79,233
C ₀ -C _{0,5} -C ₃	0,915	4,489	0,162	10,770	3,189	y = 7,974C ₀ + 1,836C _{0,5} +10,149C ₃ +20,461
C ₀ -C ₁ -C ₃	0,925	4,502	0,625	9,699	2,742	y = 7,932C ₀ + 2,017C ₁ + 9,281C ₃ + 19,874
C ₀ -C ₁ -C ₄	0,897	33,831	5,398	98,397	18,74	y = 6,696C ₀ + 1,603C ₁ + 12,069C ₄ +18,507
C ₀ -C ₂ -C ₃	0,895	36,580	5,504	115,11	20,57	y = 8,466C ₀ + 1,07C ₂ + 9,686C ₃ +26,194
C ₀ -C ₃ -C ₄	0,900	5,168	0,957	10,070	2,623	y = 7,348C ₀ + 7,288C ₃ + 5,65C ₄ +19,085
Advagraf						
Indicadores	H3gado	MAE% (n = 20)				Ecuaciones
	r ²	Media	Min.	M3x.	DS	
C ₀	0,668	14,618	0,265	67,589	8,106	y = 14,449C ₀ + 136,06
C ₀ -C ₁ -C _{2,5}	0,938	6,747	0,045	25,514	3,938	y = 12,243C ₀ - 1,593C ₁ + 8,06C _{2,5} + 54,394
C ₀ -C _{1,5} -C _{2,5}	0,934	13,287	2,004	42,486	7,163	y = 11,579C ₀ - 0,416C _{1,5} +7,337C _{2,5} +52,257
C ₀ -C ₂ -C _{2,5}	0,933	6,835	1,702	23,913	3,551	y = 11,581C ₀ - 0,075C ₂ + 7,094C _{2,5} +49,715
C ₀ -C _{2,5} -C ₃	0,934	6,929	2,579	25,058	3,498	y = 11,017C ₀ + 5,855C _{2,5} + 1,306C ₃ +51,076
C ₀ -C _{2,5} -C ₄	0,937	7,033	2,219	24,097	3,082	y = 11,326C ₀ + 5,395C _{2,5} + 2,296C ₄ +45,048
Indicadores	Riñ3n	MAE% (n = 21)				Ecuaciones
	r ²	Media	Min.	M3x.	DS	
C ₀	0,647	13,482	3,042	36,789	8,158	y = 20,91C ₀ + 74,484
C ₀ -C _{0,5} -C _{1,5}	0,903	6,651	1,152	16,934	3,851	y = 8,209C ₀ + 6,367C _{0,5} +3,482C _{1,5} + 54,19
C ₀ -C _{0,5} -C _{2,5}	0,891	7,294	0,852	15,789	3,784	y = 8,953C ₀ + 7,03C _{0,5} + 3,375C _{2,5} + 51,818
C ₀ -C _{0,5} -C ₄	0,931	5,100	0,338	16,459	3,437	y = 8,025C ₀ + 5,294C _{0,5} + 8,428C ₄ + 27,97
C ₀ -C ₁ -C _{2,5}	0,930	7,522	0,790	21,260	3,626	y = 13,162C ₀ + 4,546C ₁ + 1,774C _{2,5} +45,992
C ₀ -C ₁ -C ₄	0,894	21,15	0,533	107,62	16,94	y = 11,696C ₀ + 2,798C ₁ + 6,947C ₄ + 28,271

Segundo an3lisis, utilizando las concentraciones agrupadas por 3rgano independientemente del tipo de formulaci3n que el paciente estuviera tomando.

Se encontr3 una baja relaci3n entre C₀ y ABC₀₋₂₄ en ambos casos siendo r²=0,702 en trasplante hep3tico y r²=0,569 en trasplante renal. Como podemos ver en la figura 10 y en la tabla 12, las r² de las 5 mejores LSS es bastante similar entre ellas, por lo que hubo que analiza detenidamente el IC 95% el ME y el MAE% para

determinar cual era la mejor LSS en cada uno de los casos. En el caso de los pacientes con trasplante hepático la mejor LSS es la que utiliza extracciones a las 0; 2; 3 horas siendo el $r^2=0,913$ y el MAE% de 7,48% y en el caso de los trasplantados de rin la mejor LSS es la que utiliza extracciones a las 0; 0,5; 4 horas presentando un $r^2=0,898$ y MAE % de 5,79%.

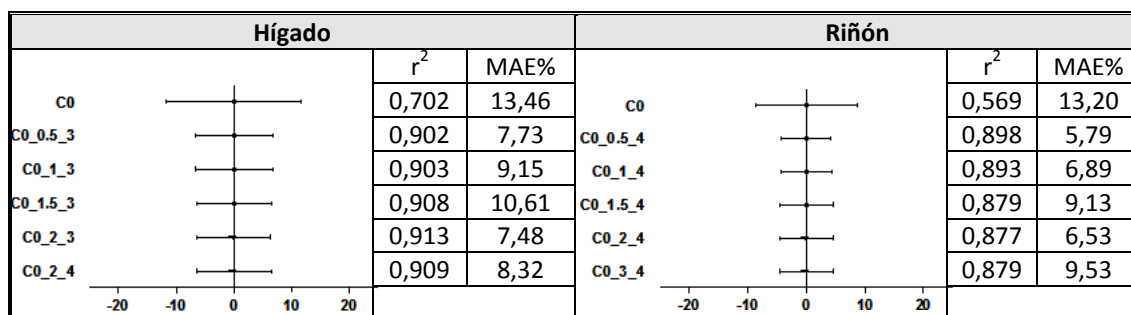


Figura 10. Representaci3n del IC 95%, r^2 y MAE% en la predici3n del ABC0-24 de las mejores LSS desarrolladas en trasplante hepático y renal independientemente de la formulaci3n

Tabla 12. Presentaci3n de las mejores LSS desarrolladas en trasplante hepático y renal y de las LSS desarrolladas utilizando solamente como variable la concentraci3n a tiempo 0 independientemente de la formulaci3n.

Hgado						
Indicadores	r^2	MAE% (n = 40)				Ecuaciones
		Media	Min.	Máx.	DS	
C ₀	0,702	13,464	0,550	65,940	7,928	$y = 14,466C_0 + 134,148$
C ₀ -C _{0,5} -C ₃	0,902	7,731	0,035	39,371	4,021	$y = 6,931C_0 + 1,774C_{0,5} + 6,895C_3 + 73,004$
C ₀ -C ₁ -C ₃	0,903	9,145	0,968	36,759	4,893	$y = 7,664C_0 + 1,283C_1 + 6,685C_3 + 67,306$
C ₀ -C _{1,5} -C ₃	0,908	10,610	0,084	45,440	6,913	$y = 7,903C_0 + 1,752C_{1,5} + 6,122C_3 + 62,747$
C ₀ -C ₂ -C ₃	0,913	7,483	0,104	38,413	4,532	$y = 8,062C_0 + 2,850C_2 + 4,763C_3 + 66,882$
C ₀ -C ₂ -C ₄	0,909	8,322	0,344	38,176	4,808	$y = 8,873C_0 + 3,965C_2 + 4,515C_4 + 55,555$
Rin						
Indicadores	r^2	MAE% (n = 42)				Ecuaciones
		Media	Min.	Máx.	DS	
C ₀	0,569	13,199	0,504	36,851	6,786	$y = 19,421C_0 + 79,612$
C ₀ -C _{0,5} -C ₄	0,898	5,790	0,207	16,711	3,692	$y = 7,918C_0 + 2,264C_{0,5} + 10,995C_4 + 23,532$
C ₀ -C ₁ -C ₄	0,893	6,893	0,027	17,126	4,817	$y = 8,810C_0 + 1,822C_1 + 10,074C_4 + 23,100$
C ₀ -C _{1,5} -C ₄	0,879	9,126	0,404	19,919	4,277	$y = 9,614C_0 + 0,718C_{1,5} + 17,231C_4 + 20,771$
C ₀ -C ₂ -C ₄	0,877	6,529	0,098	15,749	3,422	$y = 9,470C_0 - 0,633C_2 + 13,820C_4 + 14,749$
C ₀ -C ₃ -C ₄	0,879	9,528	0,476	22,938	4,657	$y = 9,197C_0 - 1,860C_1 + 14,982C_4 + 16,869$

Tercer análisis, utilizando las concentraciones agrupadas por formulaci3n independientemente del 3rgano trasplantado.

Como se puede ver en la figura 11 y en la tabla 13 se encontr3 una baja relaci3n entre la C_0 y el ABC_{0-24} siendo el $r^2=0,633$ para el Prograf y $r^2=0,686$ para el Advagraf. La mejor LSS para Prograf es la que usa la concentraci3n a las 0; 1; 3 horas de extracci3n, $r^2=0,920$ y la mejor para Advagraf es la que usa la concentraci3n a las 0; 0,5; 4 horas de extracci3n, $r^2=0,926$.

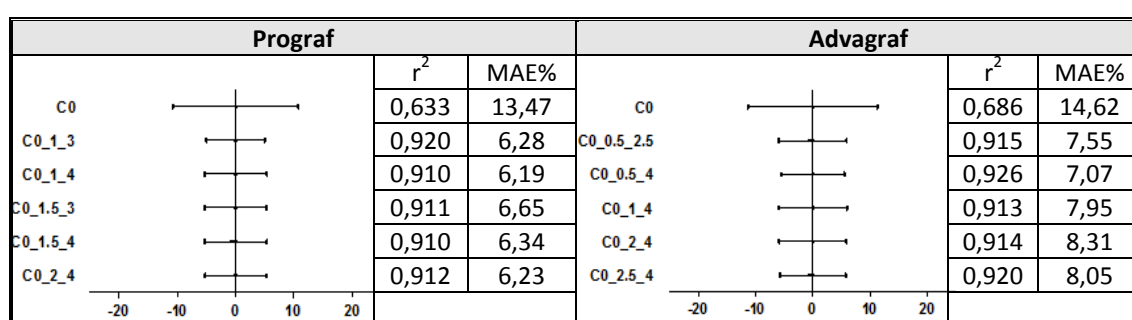


Figura 11. Representaci3n del IC 95%, r^2 y MAE% en la predici3n del ABC_{0-24} de las mejores LSS desarrolladas para Prograf y para Advagraf independientemente del trasplante

Tabla 13. Presentaci3n de las mejores LSSs desarrolladas para Prograf y para Advagraf y de las LSS desarrolladas utilizando solamente como variable la concentraci3n a tiempo 0 independientemente del trasplante.

Prograf						
Indicadores	r^2	MAE% (n = 41)			DS	Ecuaciones
		Media	Min.	Máx.		
C ₀	0,633	13,470	0,883	33,945	8,046	$y = 15,420C_0 + 114,072$
C ₀ -C ₁ -C ₃	0,920	6,283	0,103	17,335	3,610	$y = 4,496C_0 + 1,867C_1 + 9,507C_3 + 45,945$
C ₀ -C ₁ -C ₄	0,910	6,187	0,087	23,403	3,999	$y = 4,619C_0 + 2,174C_1 + 11,820C_4 + 30,250$
C ₀ -C _{1.5} -C ₃	0,911	6,653	0,131	16,015	3,386	$y = 5,029C_0 + 1,592C_{1.5} + 8,796C_3 + 56,087$
C ₀ -C _{1.5} -C ₄	0,910	6,338	0,897	22,776	3,397	$y = 5,205C_0 + 2,231C_{1.5} + 10,372C_4 + 37,918$
C ₀ -C ₂ -C ₄	0,912	6,229	0,311	20,800	3,321	$y = 5,176C_0 + 3,356C_2 + 8,675C_4 + 43,813$
Advagraf						
Indicadores	r^2	MAE% (n = 41)			DS	Ecuaciones
		Media	Min.	Máx.		
C ₀	0,686	14,623	0,399	53,553	9,575	$y = 17,005C_0 + 105,602$
C ₀ -C _{0.5} -C _{2.5}	0,915	7,548	0,089	22,045	4,356	$y = 9,188C_0 + 3,975C_{0.5} + 5,391C_{2.5} + 51,663$
C ₀ -C _{0.5} -C ₄	0,926	7,068	0,180	26,637	4,086	$y = 7,970C_0 + 4,179C_{0.5} + 7,634C_4 + 41,490$
C ₀ -C ₁ -C ₄	0,913	7,945	0,487	30,695	4,363	$y = 10,637C_0 + 1,434C_1 + 7,634C_4 + 40,462$
C ₀ -C ₂ -C ₄	0,914	8,310	0,239	29,346	4,224	$y = 10,965C_0 + 1,476C_2 + 7,204C_4 + 41,583$
C ₀ -C _{2.5} -C ₄	0,920	8,046	0,262	27,637	4,109	$y = 11,34C_0 + 2,38C_{2.5} + 5,845C_4 + 43,564$

Cuarto y último análisis

En este análisis no se dividi3 la muestra ni por 3rgano trasplantado ni por formulaci3n de TAC. Como se puede ver en la figura 12 y en la tabla 14 y a semejanza con los resultados anteriores se encontr3 una baja relaci3n entre C_0 y el ABC_{0-24} del TAC y una buena relaci3n entre los LSS desarrollados y el ABC_{0-24} . Todas las 5 LSS seleccionadas presentan unos valores de r^2 muy similares y bastante cercanos a 1 y presentan tambi3n unos valores de ME y MAE% bastante parecidos. Al analizar detenidamente las 5 últimas LSS se verifica que la que mejor predice el ABC_{0-24} es la que utiliza las concentraciones de TAC a las 0, 1 y 4 horas siendo su $r^2=0,898$. Para terminar hemos buscado de entre todas las LSSs desarrolladas la que mejores resultados originaba en cualquiera de los casos estudiados, para ello hemos seleccionado la LSS que utiliza las concentraciones a las 0, 1 y 4 horas y la hemos comparado con la LSS desarrollada utilizando solo la C_0 . Como podemos ver en la tabla 15 la LSS que usa concentraciones a 3 horas distintas (0, 1 y 4 horas) presenta menos errores de predicci3n superiores a 15% o superiores a 20% que la LSS que utiliza solo C_0 . De hecho en la mayor3a de los casos la diferencia de errores de predicci3n superiores a 15% o a 20% es estad3sticamente significativa cuando se compara con el número de errores superiores a 15% o a 20% que origina el uso de la LSS desarrollada solamente con C_0 .

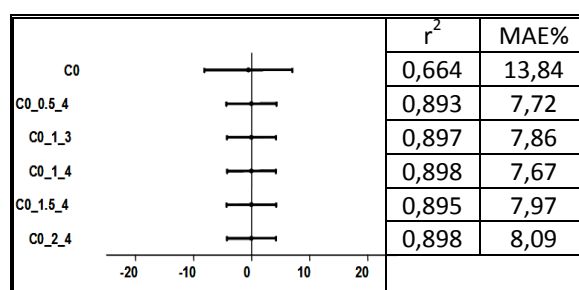


Figura 12. Representaci3n del IC 95%, r^2 y MAE% en la predicci3n del ABC_{0-24} de las mejores LSS desarrolladas independientemente del trasplante y de la formulaci3n.

Tabla 14. Presentaci3n de las mejores LSSs desarrollada y la LSS utilizando solamente como variable la concentraci3n a tiempo 0 independientemente del trasplante y de la formulaci3n.

Indicadores	r^2	MAE% (n = 82)				Ecuaciones
		Media	Min.	Máx.	DS	
C_0	0,664	13,838	0,367	54,671	8,723	$y = 16,230C_0 + 109,427$
C_0 - $C_{0,5}$ - C_4	0,893	7,720	0,001	30,573	4,406	$y = 7,746C_0 + 2,803C_{0,5} + 8,820C_4 + 43,613$
C_0 - C_1 - C_3	0,897	7,885	0,088	32,110	4,479	$y = 8,149C_0 + 2,195C_1 + 6,292C_3 + 53,077$
C_0 - C_1 - C_3	0,898	7,667	0,353	32,005	4,207	$y = 8,149C_0 + 2,297C_1 + 7,926C_4 + 39,179$
C_0 - $C_{1,5}$ - C_4	0,895	7,969	0,037	34,410	3,940	$y = 9,343C_0 + 2,106C_{1,5} + 7,303C_4 + 41,992$
C_0 - C_2 - C_4	0,898	8,089	0,211	31,523	3,879	$y = 9,129C_0 + 2,768C_2 + 6,450C_4 + 46,062$

Tabla 15. Número de predicciones con error superior a 15% o a 20% en valor absoluto (MAE%) cuando comparadas con los valores reales de ABC_{0-24} obtenidos con la LSS desarrollada solo con C_0 y la LSS desarrollada con las concentraciones a tiempos 0, 1 y 4 ($C_{0,1,4}$)

n	Formulaci3n / tipo de trasplante		20%		15%	
			C_0	LSS	C_0	LSS
20	Prograf	Hígado	3	0*	6	1*
21		Rin3n	2	0	9	0*
20	Advagraf	Hígado	4	1	6	4
21		Rin3n	5	0*	7	1*
41	Hígado		6	1*	11	5*
41	Rin3n		8	0*	17	1*
41	Prograf		8	0*	16	2*
41	Advagraf		9	2*	15	2*
82	Global		17	2*	31	8*

* $p < 0,05$ para la comparaci3n entre el número de MAE% obtenidos utilizando solamente la C_0 o la LSS $_{(0,1,4)}$ superiores a 15% o 20%.

6.4. **Peso de los genotipos de ABCB1 y POR en pacientes trasplantados de riñ3n que no expresan CYP3A5 con tratamiento estable de TAC.**

“Weight of ABCB1 and POR genes on oral tacrolimus exposure in CYP3A5 nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant. “

Gonçalo Nuno Almeida Paulo, Irene Dapía García, Rubin Lubomirov, Alberto M. Borobia, Nazareth Laura Alonso Sanchez, Laura Espinosa y Ant3nio Jesus Carcas Sansuan

Pharmacogenomics Journal

PubMed PMID: 28094348.

Factor impacto 2016: 3.815 (Q1)

- Este trabajo por sí mismo responde a la parte correspondiente a los pacientes trasplantados de riñ3n del objetivo 4 y al objetivo 5.

INTRODUCCION

Las predicciones de las LSS desarrolladas tienen un alto valor de r^2 pero aun conociendo la buena relaci3n que tienen con el ABC_{0-24} del TAC, hay que poner en manifiesto la gran variabilidad de concentraciones y de ABC_{0-24} que los pacientes que toman TAC presentan. Al hacer una revisi3n bibliográfica sobre los factores que pueden influenciar la biodisponibilidad del TAC se verifica una cierta incertidumbre en relaci3n a cuales tienen o no capacidad por si mismos de cambiar dicha biodisponibilidad. Por ello se realiz3 este estudio con el **objetivo** de evaluar la influencia que ciertas variantes genéticas involucradas en el metabolismo y transporte de TAC pudieran tener en la disposici3n del mismo. El TAC presenta un metabolismo hepático muy extenso por el citocromo 3A5 y su biodisponibilidad depende también

del complejo ABCB1. Los genotipos de POR se han relacionado directamente con la actividad enzimática del CYP 3A5 por lo que también tendrán influencia en la biodisponibilidad del TAC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Los datos utilizados en este estudio se han recogido del ensayo clínico mencionado en el apartado 6.2 de esta tesis en pacientes pediátricos trasplantados de riñón (CT-2009-017900-89). Se han utilizado los datos de ABC₀₋₂₄, de C_{max} y de C_{min} de dicho estudio. Previa firma de consentimiento informado se han recogido muestras de sangre para análisis genético a los 21 pacientes que han participado en el estudio y se ha recogido también información clínica y demográfica de cada uno de los pacientes.

Ensayos genotípicos

Se han recogido muestras sanguíneas de cada uno de los 21 pacientes participantes en el estudio. El DNA se extrajo utilizando un modelo comercial de extracción de DNA QuickGene DNA Whole Blood Kit S en el extractor semiautomático QuickGene-810 (Fujifilm Corporation, Tokio, Japan). Todos los pacientes han sido genotipados para CYP3A5*3 c.219-237A>G (rs776746), ABCB1 c.3435 C>T (rs1045642) y dos SNPs del gen de POR: c.1508C>T (POR*28, rs1057868) y c.188+6405A>G (rs2868177) utilizando ensayos comerciales de RT-PCR con sondas Taqman siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa de IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Las diferencias entre los grupos de genotipos en cada una de las variantes genéticas se calcularon por pruebas no paramétricas utilizando el

test de tendencia de Jonckheere-Terpstra. Los resultados se consideraron significativos cuando los valores de “p” eran inferiores a 0,05. No se realizaron ajustes para comparaciones múltiples al ser un estudio exploratorio.

Se desarrollaron regresiones lineales multivariantes para conocer el impacto de los factores clínicos, demográficos, del uso de medicaci3n concomitante y de las variables gen3ticas en la variabilidad de la dosis y de los valores farmacocin3ticos de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} del Advagraf ajustados por dosis y peso.

Marcador gen3tico

Para aumentar la sensibilidad de detecci3n de la influencia de las variables gen3ticas en los parámetros de disposici3n en la poblaci3n en estudio se construy3 un score gen3tico. Para evaluar el impacto de los SNPs de CYP3A5 en los parámetros farmacocin3ticos, la muestra se dividi3 en dos grupos: pacientes que expresaron CYP3A5 (*1/*1 o *1/*3) y aquellos que no (CYP3A5 *3/*3). Debido al pequeño tamaño muestral y a la plausibilidad biol3gica, la contribuci3n de las variantes gen3ticas de ABCB1 y POR en los parámetros farmacocin3ticos del TAC solo han sido analizados en los pacientes que no expresan CYP3A5. Se construy3 un modelo gen3tico aditivo utilizando las variantes gen3ticas de ABCB1 (*rs1045642*) y POR (*rs1057868* y *rs2868177*). Se han creado 3 grupos gen3ticos: uno sin variantes al3licas, otro con una o dos variantes al3licas y el tercero con 3 variantes al3licas. Se han determinado las diferencias entre los pacientes que expresan CYP3A5 y los que no lo expresan, así como las diferencias entre los 3 grupos creados por score gen3tico.

Generaci3n del modelo

Se han creado dos modelos de regresi3n lineal diferentes. Uno de los modelos incluye todos los pacientes y el otro solo los pacientes que no expresan CYP3A5. La introducci3n o no de las covariables gen3ticas y no gen3ticas (raza, peso, altura, edad, sexo, IMC, ASC, valores de hemoglobina, de hematocrito, albumina y tratamientos concomitantes) se han testado por el sistema paso a paso. Para evaluar los sesgos y la

precisi3n de los modelos se calcularon los valores predichos de ABC_{0-24} y de C_{min} ajustados por dosis y peso y estos se han comparado con los valores reales, determinando as3 el ME, el MAE y el MAE% en relaci3n al valor real.

Todos los modelos se han desarrollado utilizando los valores de ABC_{0-24} , de C_{max} y C_{min} ajustados por dosis y peso con transformaci3n logar3tmica por forma a asegurar una distribuci3n normal de las variables dependientes.

Los mismos procedimientos se han realizado para los valores farmacocin3ticos del TAC tras la ingesta de Prograf antes de la conversi3n a Advagraf.

RESULTADOS

En la tabla 16 se encuentran expuestas las caracter3sticas demogr3ficas de los pacientes incluidos en el estudio, tambi3n se encuentra la frecuencia al3lica de los pacientes para CYP3A5, ABCB1 y los dos SNPs del POR. Todas las variantes gen3ticas estudiadas se encuentran en equilibrio seg3n Hardy-Weinberg.

Resultados farmacocin3ticos y farmacogen3ticos

Para este an3lisis se seleccionaron el ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} como los principales par3metros farmacocin3ticos a estudiar y siempre se han utilizado ajustados por dosis y peso.

Como se puede ver en la tabla 17 y en la figura 13 se encuentran diferencias estad3sticamente significativas en ABC_{0-24} y C_{min} entre los genotipos de CYP3A5 (CYP3A5*3, rs776746). Los pacientes que no expresan CYP3A5 (CYP3A5*3/*3, n=17) presentan C_{max} , ABC_{0-24} y C_{min} , 72%, 119% y 210% superior respectivamente a los pacientes que expresan CYP3A5 (CYP3A5*1/*1 o *1/*3). No se han encontrado m3s diferencias significativas entre estos grupos.

Como se ha indicado, para evaluar la contribuci3n de las variantes gen3ticas de ABCB1 y POR se han seleccionado los 17 pacientes que no expresan CYP3A5 y se estudiaron los tres grupos creados por score gen3tico. Los valores farmacocin3ticos medios de TAC para cada uno de los grupos se encuentran en la tabla 17. Los pacientes

del grupo 2 presentan valores de C_{\max} , ABC_{0-24} y C_{\min} , 43%, 27% y 11% superiores a los del grupo 1 respectivamente como se puede ver tambi3n en la figura 13 d, e y f. Los valores de C_{\max} , ABC_{0-24} y C_{\min} del grupo 3 son 94%, 82% y 68% superiores a los del grupo 1 respectivamente. Al comparar los valores de ABC_{0-24} , C_{\max} y C_{\min} , en cada uno de los grupos se encuentran diferencias estadisticamente significativas entre cada uno de los grupos, $p=0,018$, $p=0,037$ y $p=0,018$ respectivamente.

**Tabla 16. Caracteristicas de los pacientes
1000G – 1000 Base de datos de genomas**

Sexo (Hombre/mujer) (n)				21/20
Raza (n)				
Cauc3sico/hispano/asi3tico/3rabe				17/1/2/1
Edad (a3os \pm SD)				12,29 \pm 4,17
Peso (kg \pm SD)				42,85 \pm 15,42
Altura (cm \pm SD)				143,4 \pm 18,16
IMC (Kg/m ² \pm SD)				19,87 \pm 3,28
ASC (m ² \pm SD)				1,30 \pm 0,33
Dosis de Advagraf (mg \pm SD)				4,8 \pm 1,70
Tiempo desde el trasplante hasta la conversi3n (a3os \pm SD)				5,390 \pm 3,25
Creatinina (mg/dL \pm SD)				0,90 \pm 0,29
Albumina (g/dL \pm SD)				3,83 \pm 0,23
Hemoglobina (g/dL \pm SD)				12,23 \pm 1,23
Cistatina C (mg/L \pm SD)				1,23 \pm 0,27
Bilirubina (mg/dL \pm SD)				0,39 \pm 0,12
Hematocrito (% \pm SD)				37,57 \pm 3,54
eGFR (mL/min \pm SD)				76,57 \pm 23,01
Informaci3n gen3tica				
Variante	Genotipo	n	frecuencia	Frecuencia en la poblaci3n (1000G)
CYP3A5 rs776746	AA (*1/*1)	1	5%	22,7%
	AG (*1/*3)	3	14%	30,4%
	GG (*3/*3)	17	81%	47%
ABCB1 rs1045642	CC	7	33%	39,6%
	CT	9	43%	41,7%
	TT	5	24%	18,7%
POR*28 rs1057868	CC (*1/*1)	11	52%	51,1%
	CT (*1/*28)	9	43%	40,5%
	TT (*28/*28)	1	5%	8,3%
POR rs2868177	AA	4	14%	35,8%
	AG	12	57%	48,4%
	GG	5	24%	15,8%

Tabla 17. Comparaci3n de los principales par3metros farmacocin3ticos ajustados por dosis y peso seg3n los diferentes genotipos analizados.

Par3metro farmacocin3tico	Variante	Genotipo	Media \pm SD	Valor p
ABC _{0_24}	CYP3A5 (rs776746)	AA	879,6	0,009
		AC	1232,24 \pm 578,64	
		CC	2507,88 \pm 967,676	
	ABCB1 (rs1045642)	CC	1967,69 \pm 2301,42	0,255
		CT	2301,42 \pm 1253,14	
		TT	2544,74 \pm 950,02	
	POR*28 (rs1057868)	CC	1884,88 \pm 808,24	0,178
		CT	2812,42 \pm 1103,67	
		TT	1164,86	
	POR (rs2868177)	AA	1886,27 \pm 985,47	0,946
		AG	2456,11 \pm 1198,81	
		GG	2038,38 \pm 667,65	
C _{max}	CYP3A5 (rs776746)	AA	71,28	0,036
		AC	112,16 \pm 34,92	
		CC	175,59 \pm 71,96	
	ABCB1 (rs1045642)	CC	144,47 \pm 48,40	0,922
		CT	182,65 \pm 94,00	
		TT	147,51 \pm 55,49	
	POR*28 (rs1057868)	CC	141,59 \pm 59,24	0,512
		CT	194,54 \pm 78,17	
		TT	84,37	
	POR (rs2868177)	AA	123,04 \pm 54,54	0,413
		AG	178,25 \pm 82,09	
		GG	152,32 \pm 53,27	
C _{min}	CYP3A5	AA	33,17	0,004
		AC	29,96 \pm 11,70	
		CC	95,38 \pm 33,79	
	ABCB1	CC	60,87 \pm 24,28	0,055
		CT	87,14 \pm 46,99	
		TT	106,85 \pm 33,31	
	POR*28	CC	71,06 \pm 34,40	0,388
		CT	99,19 \pm 44,93	
		TT	70,15	
	POR (rs2868177)	AA	70,74 \pm 21,61	0,682
		AG	87,42 \pm 48,30	
		GG	82,53 \pm 32,27	

Tabla 18. Valores del test de tendencia de Jonckheere-Terpstra realizado a los 17 pacientes que no expresan CYP3A5 divididos por el score genético creado.

Variante	Parámetro farmacocinético	Test de tendencia de Jonckheere–Terpstra (p)
ABCB1 (rs1045642)	ABC _{0-24h}	0,507
	C _{max}	0,965
	C _{min}	0,102
POR*28 (rs1057868)	ABC _{0-24h}	0,262
	C _{max}	0,575
	C _{min}	0,852
POR (rs2868177)	ABC _{0-24h}	0,715
	C _{max}	0,235
	C _{min}	0,273
Genetic score	ABC _{0-24h}	0,018
	C _{max}	0,037
	C _{min}	0,018

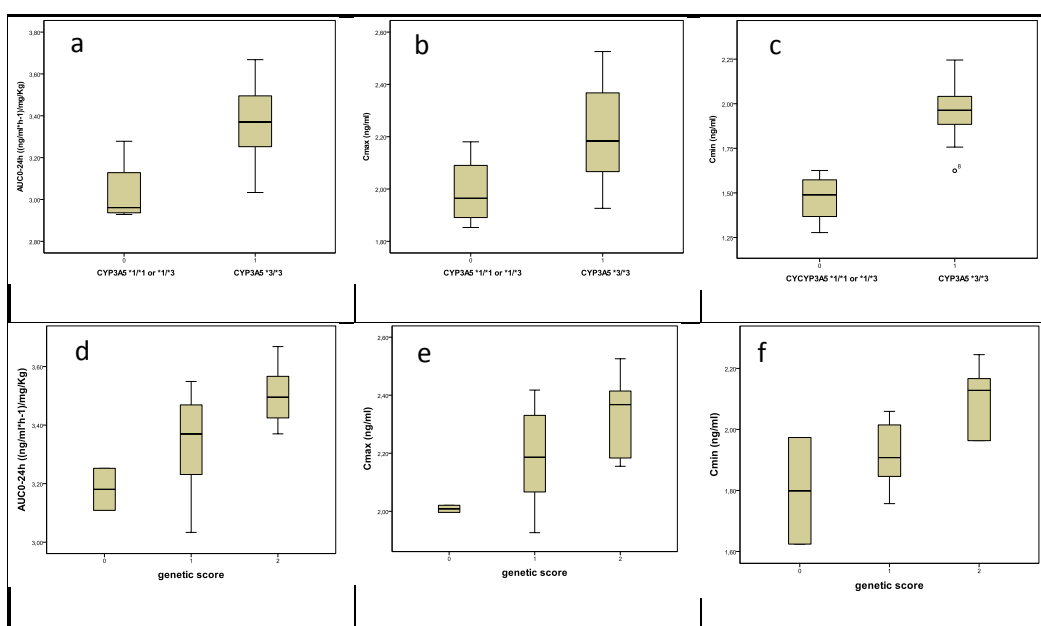


Figura 13. Distribución de los valores de ABC₀₋₂₄, C_{max} y C_{min} ajustados por dosis y peso.

Leyenda: los diagramas a, b y c presentan datos de todos los pacientes y los diagramas d, e y f presentan datos de los pacientes que no expresan CYP3A5.

a / d – dose/weight adjusted ABC_{0-24h}; b / e – dose/weight adjusted C_{max}; c / f – dose/weight adjusted C_{min}

Los datos se presentan en diagramas de cajas con intervalo al 95% y las líneas de las cajas representan el 25%, la media y el 75% de la distribución de la muestra.

Modelos explicativos

Se realiz3 un an3lisis multivariante lineal para evaluar la contribuci3n de los factores gen3ticos y no gen3ticos, a los valores de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} ajustados por dosis y peso y as3 poder hallar factores que pudieran explicar la variabilidad de los mismos en pacientes trasplantados de ri33n. En el modelo desarrollado se han incluido todos los pacientes evaluados ($n=21$) y las tres covariables que han sido finalmente incluidas en el modelo han sido: CYP3A5 (rs7766746) y el uso concomitante de Deflazacort y Metilprednisolona. Los pacientes que no expresan CYP3A5 (genotipo GG, CYP3A5*3/*3) demuestran un incremento en los par3metros farmacocin3ticos de TAC, de manera que el genotipo CYP3A5 explica 39,6%, 20,6% y 59,5% de la variabilidad existente en los valores de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} , como se puede ver en la tabla 18. El uso concomitante de Deflazacort y Metilprednisolona se relaciona con la disminuci3n de los valores de los par3metros farmacocin3ticos estudiados, de manera que el uso concomitante de Deflazacort explica el 20,9% y el 19,5% de la variabilidad de los valores de ABC_{0-24} y de C_{max} respectivamente y el uso concomitante de Metilprednisolona explica el 14,3% de la variabilidad de los valores de ABC_{0-24} .

Se construy3 un segundo modelo utilizando solamente los pacientes que no expresan CYP3A5 ($n=17$). Las variables gen3ticas explican 13,7% de la variabilidad total de ABC_{0-24} . Por otro lado, el uso concomitante de Deflazacort y de Metilprednisolona explican el 32% y el 11,1% de la variabilidad de los valores de ABC_{0-24} . El score gen3tico fue la 3nica covariable significativa cuando se intenta explicar la variabilidad de C_{min} explicando el 26,5% de la misma. Ninguna de las variables gen3ticas y no gen3ticas estudiadas explica una parte significativa de la variabilidad de los valores de C_{max} .

Evaluaci3n de los modelos desarrollados

Utilizando los modelos desarrollados para determinar los valores de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} ajustados por dosis y peso hemos calculado el MAE y el MAE% para cada modelo. Como se puede ver en la tabla 19 los errores medios de las predicciones est3n entre el 18% y el 28%.

Tabla 19. Modelos desarrollados y sus respectivos MAE% para los valores de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} .

	Modelo		Coefficientes no-estandarizados	Coefficientes estandarizados	Valor p	Variabilidad explicada (%)	MAE% Media (IQR)
			B \pm SE	Beta			
Todos los participantes (n=21)	ABC_{0-24} $r^2_c = 0,571$	(Constante)	3,179 \pm 0,083		0,000		25,78 (7,13 – 34,88)
		CYP3A5	0,371 \pm 0,089	0,519	0,001	39,6%	
		Metilprednisolona	-0,212 \pm 0,080	-0,436	0,017	14,3%	
		Deflazacort	-0,376 \pm 0,121	-0,513	0,006	20,9%	
	C_{max} $r^2_c = 0,365$	(Constante)	2,115 \pm 0,088		0,000		25,63 (9,43 – 40,57)
		CYP3A5	0,246 \pm 0,094	0,519	0,018	20,6%	
		Metilprednisolona	-0,172 \pm 0,085	-0,436	0,059	-	
		Deflazacort	-0,325 \pm 0,127	-0,513	0,021	19,5%	
	C_{min} $r^2_c = 0,604$	(Constante)	1,527 \pm 0,090		0,000		27,66 (6,91 – 40,22)
		CYP3A5	0,504 \pm 0,095	0,827	0,000	59,6%	
		Metilprednisolona	-0,093 \pm 0,086	-0,184	0,295	-	
		Deflazacort	-0,143 \pm 0,130	-0,175	0,285	-	
Participantes que no expresan CYP3A5 (n=17)	ABC_{0-24} $r^2_c = 0,573$	(Constante)	3,390 \pm 0,090		0,000		18,07 (7,34 – 26,91)
		Score genético	0,117 \pm 0,050	0,413	0,035	13,7%	
		Metilprednisolona	-0,174 \pm 0,081	-0,424	0,050	11,1%	
		Deflazacort	-0,474 \pm 0,140	-0,639	0,005	32,0%	
	C_{max} $r^2_c = 0,367$	(Constante)	2,209 \pm 0,129		0,000		22,36 (5,96 – 32,53)
		Score genético	0,115 \pm 0,060	0,410	0,078	-	
		Metilprednisolona	-0,148 \pm 0,098	-0,363	0,153	-	
		Deflazacort	-0,352 \pm 0,169	-0,478	0,058	-	
	C_{min} $r^2_c = 0,403$	(Constante)	1,860 \pm 0,109		0,000		21,11 (6,90 – 28,98)
		Score genético	0,136 \pm 0,050	0,558	0,019	26,5%	
		Metilprednisolona	-0,067 \pm 0,082	-0,189	0,429	-	
		Deflazacort	-0,239 \pm 0,142	-0,375	0,116	-	

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Los pacientes que reciben un trasplante requieren regímenes terapéuticos complejos que, como describen muchos autores, contribuyen a una alta incidencia de incumplimiento terapéutico (17, 59). Algunos estudios describen que la pérdida del órgano trasplantado por incumplimiento terapéutico se encuentra entre el 16,3% y el 26,4% y el 19,9% de rechazos tardíos en pacientes adultos siendo que estos valores son superiores en la población más joven (57, 58). El cambio de formulación de Prograf a Advagraf se hace con la intención de mejorar el cumplimiento terapéutico ya que existen evidencias de que el cumplimiento terapéutico mejora cuando se pasa de una formulación que requiere más de una dosis diaria a una que solo necesita una dosis diaria (15).

El TAC es un agente inmunosupresor utilizado en los pacientes trasplantados y se caracteriza por su estrecho margen terapéutico. Algunos estudios publicados indican que para evitar episodios de rechazo o de toxicidad, es crítico alcanzar y mantener concentraciones adecuadas en sangre (59, 60). Por lo que es imprescindible un seguimiento muy cercano de estos pacientes y una buena monitorización de la exposición del paciente al TAC. El estudio de la exposición total de un paciente a un determinado fármaco generalmente se hace mediante extracciones sanguíneas seriadas que conllevan a largas estancias en los hospitales. Esos periodos de hospitalización además de incómodos para los pacientes no sólo por el tiempo pero también por el número de extracciones sanguíneas necesarias son también muy dispendiosos. Estos hechos hacen pertinente el desarrollo de técnicas de muestreo abreviado que nos den valores de exposición al fármaco lo más cercanos a la realidad posible.

Al estudiar una molécula como el TAC, hay que tener en cuenta también la gran variabilidad intra e inter individual que presenta, estando esta variabilidad asociada en gran medida a factores genéticos y presentado unos valores entre el 4% y el 89% (61). El estudio de la variabilidad de esta molécula y su relación con las características

genéticas de los pacientes ayudará en la optimización de estrategias terapéuticas aumentando así la eficacia farmacológica y reduciendo la aparición de efectos adversos.

El primer y segundo artículos de esta memoria hacen una comparación entre los valores farmacocinéticos que presentan cada una de las formulaciones de TAC y describen la evolución de pacientes trasplantados de hígado o riñón cuyo tratamiento ha sido convertido de Prograf a la formulación de liberación lenta Advagraf. La evolución de los pacientes se hace en varios puntos distintos a lo largo de un año para conocer el éxito de la conversión y determinar si esa sustitución fue adecuada o no. El desarrollo y análisis de ambos artículos es similar por lo que nos permite comparar los resultados obtenidos entre ellos. Comparando los valores de los parámetros farmacocinéticos de ambas formulaciones en ambos trasplantes podemos ver que los valores medios de ABC_{0-24} y de C_{max} son superiores en el caso de los pacientes trasplantados de hígado que los trasplantados de riñón, siendo que estas diferencias se pueden deber a la diferencia de edad de los pacientes y a su peso. Los pacientes trasplantados de riñón también presentaban valores de concentración de TAC a tiempo 0, 12 y 24 horas inferiores a los valores que presentaban los pacientes trasplantados de hígado, lo que explicaría la diferencia existente en el ABC_{0-24} . Desde un punto de vista puramente farmacocinético, la conversión de Prograf a Advagraf siguiendo un ratio de dosis de 1:1, demostró ser adecuada en la población trasplantada de hígado confirmando así los resultados obtenidos por otros autores anteriormente (61), pero no en los pacientes trasplantados de riñón. Esta diferencia se puede deber a la diferencia de edades de los pacientes incluidos en ambos estudios. Los valores obtenidos de IC 90% de ABC_{0-24} y de C_{max} en el caso del trasplante hepático son de 85,37 a 110,19 y de 90,8 a 112,1 respectivamente lo que nos permite afirmar en este caso que las dos formulaciones son bioequivalentes. Las dos formulaciones no se pueden considerar bioequivalentes en el trasplante de riñón porque los valores del IC90% de ABC_{0-24} y de IC 90% de C_{max} no se encuentran dentro del intervalo de confianza estipulado internacionalmente para moléculas de estrecho margen terapéutico (IC 90% de ABC_{0-24} = 79,91 a 95,13 y IC 90% de C_{max} = 71,60 a 92,87)

aunque en este caso sabiendo que estamos comparando una molécula de liberación modificada con otra de liberación normal es de esperar que la C_{max} sea distinta.

Durante el periodo de seguimiento de los pacientes trasplantados estudiados encontramos una tendencia en ambas poblaciones que se registró entre el tercer mes y el sexto mes de seguimiento en los que se registraron valores inferiores de las concentraciones y concentraciones ajustadas por dosis de TAC en sangre demostrando una tendencia a volver a los valores iniciales al final del año de seguimiento. Estos valores inferiores de concentración de TAC durante este periodo de tiempo también fueron encontrados por otros autores en ambos tipos de trasplante y a semejanza de nuestros resultados sus valores de concentraciones también tienden a volver a los valores iniciales al año de seguimiento (63, 64). Son difíciles de encontrar las razones que puedan justificar esta variación de la concentración de TAC entre el tercer y el sexto mes siendo que una de ellas podrían ser los cambios que la población de esta edad sufre en pequeños periodos de tiempo en términos de crecimiento y de desarrollo de las funciones corporales que podría llevar a una regresión a la media que es un fenómeno visto con alguna frecuencia en estudios de este tipo, estos cambios en el desarrollo pueden influenciar el metabolismo y la excreción del fármaco lo que conllevaría a cambios en las concentraciones. Otra razón que podría explicar esta variación sería que la variabilidad intra individual de C_{min} en la clínica es alta y que ajustes mínimos en la dosis de los pacientes son frecuentes. En cualquier caso estos resultados solo vienen a confirmar que estos pacientes requieren una monitorización muy cercana siendo esta monitorización aún más importante en pacientes que presenten valores cercanos al límite inferior del rango de eficacia.

Al año de seguimiento no se registró degradación del órgano trasplantado en ninguno de los estudios realizados y no se registraron alteraciones significativas en los valores analíticos de los pacientes. Se han registrado 5 efectos adversos, 2 en el grupo de pacientes trasplantados de hígado y 3 en el grupo de pacientes trasplantados de ri n n, pero ninguno de ellos estaba relacionado con el fármaco.

Al conocer la necesidad de hacer una monitorización muy cercana a los pacientes trasplantados, cuyo principal tratamiento inmunosupresor es el TAC, se hace imprescindible el desarrollo de técnicas de muestreo abreviado que permitan, no solo

disminuir los tiempos de admisi3n en el hospital, sino tambi3n reducir tanto los gastos asociados a esas instancias como las molestias de los pacientes. Para ello hemos estudiado la farmacocin3tica de los 41 pacientes trasplantados (20 pacientes trasplantados de h3gado y 21 trasplantados de ri3n3n) y desarrollamos LSS para predecir el ABC_{0-24} de este f3rmaco. Este desarrollo se hizo teniendo siempre en cuenta el estrecho margen terap3utico del TAC y el riesgo asociado a no mantener las concentraciones del f3rmaco dentro del rango determinado como seguro y eficaz. Como se demuestra en las tablas 9 y 10 ambas formulaciones presentan valores de disposici3n similares pero ambas requieren diferente n3mero de ingestas diarias lo que conlleva a que tengan diferentes perfiles de concentraciones. Nuestro principal objetivo fue el de desarrollar LSSs que nos permitieran evaluar la exposici3n diaria al f3rmaco (ABC_{0-24}). En el caso del Prograf se podr3an desarrollar LSS para determinar la exposici3n al f3rmaco en el per3odo de 12 horas como lo han hecho varios autores (65-68), pero eso no nos dar3a a conocer la exposici3n diaria total al f3rmaco y nos obligar3a a desarrollar dos LSSs distintas, una para cada periodo de 12 horas ya que, como se puede ver en la figura 8, el Prograf presenta una exposici3n bastante diferente despu3s de la ingesta del f3rmaco por la ma3ana y por la tarde. Existen pocas evidencias y pocos estudios que indiquen cual deber3a de ser la exposici3n diaria de cada paciente al TAC, pero existe un consenso en que ese debe de ser el par3metro a estudiar, ya que existe una baja relaci3n entre la C_0 y el rechazo agudo de 3rganos trasplantados (69). Este dato enfatiza la necesidad de desarrollar herramientas que puedan determinar la exposici3n diaria global del paciente al f3rmaco como forma de aumentar la eficacia y la seguridad del mismo.

En nuestro an3lisis encontramos una relaci3n baja entre la C_0 y el ABC_{0-24} para ambas formulaciones; esta baja relaci3n conlleva un MAE% superior en comparaci3n con el obtenido con los modelos LSS seleccionados en cada uno de los casos, como se puede ver en las tablas 11 a 14.

Se han hecho m3ltiples an3lisis para determinar cu3l ser3a la mejor LSS para predecir el ABC_{0-24} en pacientes tratados con TAC calculando el r^2 , el ME y el MAE%. Los valores de r^2 , superiores a 0,9, de las LSS seleccionadas y el MAE% de las predicciones de nuestros modelos, inferiores a 10%, nos permiten afirmar que

nuestros modelos son exactos y precisos. Este es el primer trabajo publicado en el que se presentan LSS que permiten conocer la disponibilidad del Prograf en el periodo de 0 a 24 horas.

Este estudio presenta algunas limitaciones. Primero las regresiones lineares múltiples consideran a la concentraci3n a cada uno de los puntos como variables independientes, cuando en realidad no lo son. Otra limitaci3n relacionada es que los puntos a los que se determina la concentraci3n de TAC en sangre deben de ser rigurosamente cumplidos. A pesar de estas limitaciones se pueden encontrar innumerables ejemplos de modelos de LSS en la literatura que han demostrado ser exactos y precisos en el cálculo de ABC. Segundo, el tamaño muestral de nuestro estudio es reducido, aunque el exhaustivo muestreo a lo largo de las 24 horas despu3s de la administraci3n de cada una de las formulaciones permite una buena selecci3n de los puntos a incluir en la LSS para determinar el ABC_{0-24} . De hecho, si analizamos los resultados de las LSS seleccionadas, el número de predicciones con un MAE% superior a 15% es muy reducido. Tercero, seria ventajoso hacer una validaci3n externa de nuestras LSS, esta validaci3n requeriría un muestreo intensivo en una nueva cohorte de pacientes. Cuarto, el rango de edades de los pacientes incluidos es más amplio en los pacientes trasplantados de ri3n, de 4 a 18 años, mientras que los pacientes incluidos en el estudio de trasplante de hígado es de 12 a 18 años. Aunque este hecho podría introducir heterogeneidad en las LSSs en que se han utilizado datos de ambas poblaciones, la muestra gana en representatividad y el MAE% no se ve significativamente afectado, se comparamos los datos de las tablas 13 y 14 con los datos de la tabla 11. El uso concomitante de otros fármacos no debería de influenciar los datos del análisis presentado ya que todos los pacientes incluidos se encontraban estables y con dosis estables de todos los fármacos.

Las LSSs presentadas serán más efectivas cuando se hace una selecci3n previa de las mismas. La selecci3n de las LSSs se hará en funci3n de las características de los pacientes, tipo de trasplante realizado, y tendrá en cuenta el tiempo que los pacientes permanecerán en el centro durante la consulta. Al hacer más restrictivos los criterios de selecci3n de las LSSs el error de los valores predichos disminuye, pero se aumentará el riesgo a cometer errores. El uso de una sola LSS para determinar la exposici3n al

fármaco independientemente del órgano trasplantado y de la formulación utilizada es más sencillo pero la exactitud de las predicciones se reduce un poco, especialmente en pacientes con trasplante hepático. Aunque la selección de LSS específicas para cada caso pueden ser realizadas por otras consideraciones como pueden ser los puntos de extracción sanguínea, por ejemplo, un esquema de extracciones a tiempos 0, 1 y 3 será más fácil de manejar que un esquema de extracciones a tiempos 0, 1 y 4.

En nuestro caso la mejor LSS global sería la LSS que utiliza los tiempos de extracción a las 0, 1 y 4 horas que como podemos ver en la tabla 15 presenta resultados significativamente mejores que si utilizamos solamente la concentración a tiempo 0. El número de predicciones con un error absoluto superior a 20% o a 15% es siempre bastante superior en los modelos que solo utilizan C_0 .

Con el análisis farmacocinético realizado anteriormente del TAC y como habían descrito otros autores antes que nosotros (34-37), queda patente la gran variabilidad intraindividual que existe en este fármaco. Una de las razones que puede justificar esa variabilidad es la carga genética de cada paciente. Con los objetivos de clarificar un poco más la variabilidad del TAC y también de poder optimizar las estrategias terapéuticas, hemos realizado un análisis exploratorio de las variables genéticas y clínicas que puedan tener influencia en la exposición de los pacientes al TAC.

El TAC presenta una variabilidad inter-individual en la biodisponibilidad oral de entre 4% y 89% en pacientes trasplantados de rinn (61). La variabilidad existente se puede explicar en gran medida por las variantes genéticas que afectan a la enzima metabolizadora CYP3A5, y las variantes genéticas asociadas con ABCB1 y POR (70-73).

Conociendo esta variabilidad hemos realizado estudios cuyo objetivo fue el de explorar el impacto de variables genéticas y clínicas en la exposición total al TAC en pacientes trasplantados de hígado y rinn. No se ha encontrado ninguna relación entre los genotipos de los pacientes trasplantados de hígado y la exposición de TAC. Este resultado se puede deber a que hemos determinado los genotipos de los receptores de los órganos pero no de los donantes, que según algunos autores es más relevante para el metabolismo del TAC que el de los receptores (70-73). En el caso de los pacientes trasplantados de rinn, cómo podemos ver en el cuarto artículo presentado

en esta memoria, si hemos encontrado relaci3n entre sus caracter3sticas gen3ticas y los valores farmacocin3ticos del TAC.

En el primer an3lisis univariante con los 21 pacientes trasplantados de ri3n3n, cuyos resultados se encuentran en la tabla 17, hemos encontrado que solo existe relaci3n entre los alelos de CYP3A5 (SNP rs776746) y la disposici3n de TAC. Esta relaci3n al igual que lo que se puede encontrar en la literatura (34, 37, 70) afecta a los tres par3metros de disposici3n del TAC estudiados ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} . Este hecho confirma el gran impacto que tienen los genotipos de CYP3A5 en la disposici3n de TAC, pero 3cu3l es la variabilidad que explican estos genotipos?. Para contestar a esta pregunta hemos realizamos un an3lisis multivariante incluyendo los 21 pacientes y comprobamos que las variables gen3ticas de CYP3A5 explican el 40%, 21% y 60% de la variabilidad existente en los valores ajustados por dosis y peso de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} respectivamente en los pacientes trasplantado de ri3n3n con dosis estable de Advagraf (tabla 19) siendo que hemos obtenido resultados similares cuando los pacientes estaban con tratamiento estable de Prograf.

La influencia de los polimorfismos de ABCB1 en la exposici3n global al TAC ha sido extensamente estudiada, existiendo aun as3 bastante controversia en relaci3n a los resultados obtenidos. Algunos autores describen que no existe relaci3n entre los genotipos de ABCB1 y la exposici3n al TAC (77) mientras que otros autores encuentran relaci3n entre los pacientes homocig3ticos para el alelo C y la necesidad de una mayor dosis de TAC para alcanzar los niveles terap3uticos (78). En nuestras determinaciones y como se puede ver en la tabla 17 no hemos encontrado relaci3n entre los genotipos de ABCB1 y los valores ajustados por dosis y peso de ABC_{0-24} , C_{max} o C_{min} .

El POR una coenzima unida a la membrana celular que funciona como un donante de electrones al complejo enzim3tico CYP3A5, por lo que sus variantes gen3ticas pueden estar relacionadas con la actividad enzim3tica de CYP3A5. Algunos autores de hecho han encontrado una relaci3n entre los pacientes que presentan alelos POR*28 T y la necesidad de tomar mayores dosis de TAC en pacientes que expresan CYP3A5 pero no en pacientes que no expresan CYP3A5 (79, 80). En nuestro an3lisis no hemos encontrado relaci3n estad3sticamente significativa entre los valores ajustados por la dosis y el peso del ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} en los pacientes con diferentes

alelos de *POR**28 ($p=0.178$, $p=0.512$ and $p=0.388$ respectivamente), pero como podemos ver en la tabla 17, si hemos encontrado una tendencia en estos parámetros en los pacientes portadores de *POR**28.

Recientemente un polimorfismo intrónico (*rs2868177*) en el gen de *POR* se relacionó con mayores necesidades de dosis de warfarina (80) pero al igual que con el análisis anterior no hemos encontrado relación entre los genotipos de este polimorfismo y los valores de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} ajustados por dosis y peso.

Además de los diferentes genes y genotipos que pueden influenciar la actividad enzimática de *CYP3A5*, también son conocidos los efectos inductores o inhibidores enzimáticos de algunos fármacos. Al conocer los tratamientos concomitantes de los pacientes incluidos en el estudio hicimos un análisis para conocer la relación entre estos fármacos y los valores ajustados por la dosis y el peso de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} . Los únicos fármacos administrados concomitantemente que tienen relación con los parámetros farmacocinéticos estudiados son el Deflazacort y la Metilprednisolona, siendo estos fármacos conocidos inductores enzimáticos de *CYP3A5*. Pero en los modelos desarrollados solamente el uso concomitante de Deflazacort se retuvo, explicando el 21% y el 20% de la variabilidad del ABC_{0-24} y del C_{max} ajustados por dosis y peso respectivamente. No se ha encontrado relación entre los valores de C_{min} ajustados por dosis y peso y el uso concomitante de Deflazacort.

En la figura 13 podemos ver la gran variabilidad que existe en los parámetros farmacocinéticos estudiados ajustados por dosis y peso, principalmente en los pacientes que no expresan *CYP3A5* (*CYP3A5* *3/*3). Esta variabilidad fue descrita también por otros autores (37,41).

Dado que la mayoría de la población caucásica no expresa *CYP3A5* hemos decidido estudiar esta variabilidad en el grupo de 17 pacientes que no expresan *CYP3A5*. Para estudiar la variabilidad en el subgrupo de pacientes que no expresan *CYP3A5* hemos seleccionado estudiar los genotipos de *ABCB1* (*rs1045642*) y *POR* (*rs1057868* y *rs2868177*), ya que al revisar la literatura existente se encontraron artículos que describen la relación entre los polimorfismos de cada uno de estos genotipos y la concentración de TAC en la sangre (42-47). Se ha estudiado la relación entre cada uno de los polimorfismos de estos genotipos individualmente y no se

encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre ellos y los parámetros farmacocinéticos estudiados.

Al determinar que los polimorfismos de ABCB1 (*rs1045642*) y *POR* (*rs1057868* y *rs2868177*) individualmente no presentaban relación con los parámetros farmacocinéticos, procedimos a desarrollar un método para aumentar la sensibilidad de nuestro análisis estadístico. Para ello, creamos un score genético aditivo utilizando las variantes genéticas de ABCB1 (*rs1045642*) y *POR* (*rs1057868* y *rs2868177*) y, cómo podemos ver en la tabla 18 y en la figura 13, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los valores ajustados de ABC_{0-24} , C_{max} y C_{min} de cada uno de los grupos formados por el score genético. Al aplicar el score genético en un análisis multivariante, y cómo podemos ver en la tabla 19, encontramos que esta variable explica el 14% y el 27% de la variabilidad de los valores de ABC_{0-24} y de C_{min} respectivamente.

En este último análisis realizado, el uso concomitante de Deflazacort o Metilprednisolona explican el 32% y el 11% de la variabilidad de ABC_{0-24} ajustado por dosis y peso respectivamente.

El MAE% de todos los modelos desarrollados es inferior al 28%, indicando que, si los resultados son reproducibles en otras poblaciones pediátricas independientes, estos modelos se podrían utilizar en la práctica clínica habitual para mejorar las predicciones de la exposición al TAC.

Estos resultados junto con las LSSs desarrolladas aportan un paso más en dirección a la individualización de la dosificación de estos pacientes y la mejora de la calidad de vida de los mismos.

Nuestro equipo ha desarrollado un protocolo, actualmente en estudio, para evaluar el efecto de los diferentes polimorfismos de CYP3A5, CYP3A4, CYP3A7, ABCB1, *POR* y NR/2 en la farmacocinética del TAC en una cohorte pediátrica de pacientes trasplantados de riñón con concentraciones estables del fármaco (82).

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La sustituci3n de la formulaci3n de liberaci3n normal Prograf por la formulaci3n de liberaci3n lenta Advagraf demostr3 ser adecuada en ambas poblaciones estudiadas, ya que sus par3metros farmacocin3ticos han demostrado ser similares con ambas formulaciones y todos los pacientes han permanecido estables hasta 1 a1o tras la conversi3n.
2. Se han desarrollado cuatro grupos de LSSs con los datos de los pacientes estudiados. La aplicaci3n de las LSS desarrolladas demuestran ser muy precisas, por lo que facilitar3n la monitorizaci3n de estos pacientes.
3. La frecuencia de los genotipos de CYP3A5*3 c.6986A>G (rs776746), ABCB1 c.3435 C>T (rs1045642) y POR c.1508C>T (rs1057868) y c.188+6405A>G (rs2868177) de los pacientes trasplantados de ri1n3n se ha estudiado y queda descrita en la tablas 5 y 16 de esta memoria. Adicionalmente podemos concluir que la distribuci3n al3lica de la poblaci3n estudiada sigue el equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos estudios realizados.
4. Los 3nicos polimorfismos estudiados en los pacientes trasplantados de ri1n3n que por s3 mismos presentan influencia estad3sticamente significativa en los par3metros farmacocin3ticos del TAC son los del CYP3A5, ya que existe una diferencia muy marcada entre el grupo de pacientes que expresa CYP3A5 y el grupo de pacientes que no lo expresan. Los polimorfismos del gen CYP3A5 explican casi el 40% de la variabilidad de ABC_{0-24} , casi el 21% de la variabilidad de C_{max} y casi el 60% de la variabilidad de C_{min} .
5. El modelo farmacogen3tico desarrollado permite explicar un porcentaje muy importante de la variabilidad farmacocin3tica del TAC, habi3ndose encontrado una relaci3n muy significativa entre el uso de Deflazacort y los par3metros farmacocin3tico, algo poco mencionado en la literatura. Estos

resultados deberán ser confirmados en cohortes de pacientes independientes.

6. El modelo farmacogenético y las estrategias LSS desarrolladas podrán contribuir a mejorar la individualización de la dosificación de estos pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Billingham RE, Krohn PL, Medawar PB, Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits, *Br Med J*,1951;1:1157- 1163
2. Schwartz RH, Dameshek W, Drug-induced immunological tolerance, *Nature* 1959;183:1682-1683
3. Calne RY, Renal transplantation in man: a review, *Br J Surg* 1964;51:282-293,
4. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H, Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocyte agent, *Agents Actions* 1976;&:468-475,
5. Calne RY, White DJG, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC et al, Cyclosporine A in patients receiving renal allografts from cadaver donors, *Lancet* 1978;II:1323-1327, 604
6. Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S, Gordon RD, Esquivel CO, Tzakis AG, et al, Experience with 1000 liver transplants under cyclosporine-steroids therapy: a survival report, *Transplant Proc* 1988;20:498-504,
7. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, et al, Discovery of FK 506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*, *Transplant Proc* 1987;19:4-8,
8. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A, FK 506 for liver, kidney and pancreas transplantation, *Lancet* 1989; 2:1000-04,
9. Sollinger HW, Eugui EM, Allison AC, RS-61443: mechanism of action, experimental and early clinical results, *Clin Transplantation* 1991;5:523,
10. Kahan B, The three fates of immunosuppression in the next millenium: selectivity, synergy, and specificity, *Transpl Int* 1996;9:527-534,
11. Keown P, Kahan B,D,, Johnston G, Levy G, Dunn SP, Cittero F, et al, Optimization of cyclosporine therapy with new therapeutic drug monitoring strategies: report from the international Neoral TDM advisory consensus meeting (Vancouver, November 1997), *Transplant Proc* 1998; 30: 1341-45,

12. Butler JA, Roderick P, Mullee M, Mason JC, Peveler RC, Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review, *Transplantation*, 2004 Mar 15;77(5):769-76,
13. Fennell RS, Foulkes LM, Boggs SR, Family-based program to promote medication compliance in renal transplant children, *Transplant Proc*, 1994 Feb;26(1):102-3,
14. Sudan DL, Shaw BW Jr, Langnas AN, Causes of late mortality in pediatric liver transplant recipients, *Ann Surg*, 1998 Feb;227(2):289-95,
15. Weng FL, Israni AK, Joffe MM, Hoy T, Gaughan CA, Newman M, Abrams JD, Kamoun M, Rosas SE, Mange KC, Strom BL, Brayman KL, Feldman HI, Race and electronically measured adherence to immunosuppressive medications after deceased donor renal transplantation, *J Am Soc Nephrol*, 2005 Jun;16(6):1839-48, Epub 2005 Mar30,
16. Russell C, Conn V, Ashbaugh C, Madsen R, Wakefield M, Webb A, Coffey D, Peace L, Taking immunosuppressive medications effectively (TIMELink): a pilot randomized controlled trial in adult kidney transplant recipients, *ClinTransplant*, 2011 Nov-Dec;25(6):864-70, doi: 10.1111/j.1399-0012.2010.01358.x, Epub 2010 Nov 16, PubMed PMID: 21077956; PubMed Central PMCID: PMC3130117,
17. Dew MA, DiMartini AF, De Vito Dabbs A, Myaskovsky L, Steel J, Unruh M, Switzer GE, Zomak R, Kormos RL, Greenhouse JB, Rates and risk factors for nonadherence to the medical regimen after adult solid organ transplantation, *Transplantation*, 2007 Apr 15;83(7):858-73, PubMed PMID: 17460556,
18. de Wildt SN, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, Brojeni PY, van der Heiden IP, Parshuram C, Nulman I, Koren G, (2011) The interactions of age, genetics, and disease severity on tacrolimus dosing requirements after pediatric kidney and liver transplantation, *Eur J Clin Pharmacol*, 23, PMID: 21698374
19. Halloran PF, Immunosuppressive drugs for kidney transplantation, *N Engl J Med*, 2004 Dec 23;351 (26):2715-29, Review, Erratum in: *N Engl J Med*, 2005 Mar 10;352(10):1056, PMID: 15616206

20. Wong W, Venetz JP, Tolkoff-Rubin N, Pascual M, 2005 immunosuppressive strategies in kidney transplantation: which role for the calcineurin inhibitors? Transplantation, 2005 Aug 15;80(3):289-96, Review, PMID: 16082321,
21. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD, (2004) Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology, Transplantation, 27;78(4):557-65, PMID: 15446315
22. Cabello M, García P, González-Molina M, Díez de los R os MJ, García-S ız M, Gutiérrez C, López V, Sola E, Burgos D, Hernández D, (2010) Pharmacokinetics of once-versus twice-daily tacrolimus formulations in kidney transplant patients receiving expanded criteria deceased donor organs: a single center, randomized study, Transplant Proc.,; 42(8):3038-40, PMID: 20970603,
23. Kr mer BK, Charpentier B, B ckman L, Silva HT Jr, Mondragon-Ramirez G, Cassuto-Viguier E, Mourad G, Sola R, Rigotti P, Mirete JO (2010) Tacrolimus Prolonged Release Renal Study Group, Tacrolimus once daily (ADVAGRAF) versus twice daily (PROGRAF) in de novo renal transplantation: a randomized phase III study, Am J Transplant.,; 10(12):2632-43, PMID: 20840480,
24. Wlodarczyk Z, Squifflet JP, Ostrowski M, Rigotti P, Stefoni S, Citterio F, Vanrenterghem Y, Kr mer BK, Abramowicz D, Oppenheimer F, Pietruck F, Russ G, Karpf C, Undre N, (2009) Pharmacokinetics for once- versus twice-daily tacrolimus formulations in de novo kidney transplantation: a randomized, open-label trial, Am J Transplant.,; 9(11):2505-13, PMID: 19681813,
25. LaRosa C, Baluarte HJ, Meyers KE, (2011) Outcomes in pediatric solid-organ transplantation, Pediatr Transplant.,; 15(2):128-41, PMID: 21309962,
26. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE, (2003) Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children, N Engl J Med, 18;349(12):1157-67, PMID: 13679531,
27. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, McMaster P, Wong SH, Zylber-Katz E, Christians U, Winkler M, Fitzsimmons WE, Lieberman R, (1995) Consensus document: therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506), Ther Drug Monit, 17(6):606-14, PMID: 8588229,

28. McMaster P, Mirza DF, Ismail T, Vennarecci G, Patapis P, Mayer AD, (1995) Therapeutic drug monitoring of tacrolimus in clinical transplantation, *Ther Drug Monit*;17(6):602-5, PMID: 8588228,
29. Staatz CE, Tett SE, (2004), Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation, *Clin Pharmacokinet*; 43(10):623-53 PMID: 15244495,
30. Antignac M, Barrou B, Farinotti R, Lechat P, Urien S, (2007) Population pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in kidney transplant patients,*Br J Clin Pharmacol*; 64(6):750-7, PMID: 17425625;
31. Fujisawa USA, Inc, Prograf (tacrolimus) prescribing information, Deerfield, IL; 1997,
32. Baraldo M, Furlanut M, (2006) Chronopharmacokinetics of ciclosporin and tacrolimus, *Clin Pharmacokinet*; 45(8):775-88, PMID:16884317
33. Tada H, Satoh S, Iinuma M, Shimoda N, Murakami M, Hayase Y, Kato T, Suzuki T, (2003) Chronopharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients: occurrence of acute rejection, *J Clin Pharmacol*; 43(8):859-65, PMID: 12953343,
34. Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M, Brandt D, Van Kerkhove V, Malaise J, et al, The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and ABCB1 on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function, *Clin Chem Lab Med*, 2006;44(10):1192-8, PubMed PMID: 17032130,
35. Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, et al, Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection, *Transplant Proc*, 1999 Feb-Mar;31(1-2):296-8, PubMed PMID: 10083114,
36. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, et al, Time-related clinical determinants of long-term Tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients, *Clin Pharmacokinet*, 2004;43(11):741-62, PubMed PMID: 15301578,
37. Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V, et al, Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose

- requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids, *Transplantation*, 2005 Oct 15;80(7):977-84, PubMed PMID: 16249748.
38. Chen B, Shi HQ, Liu XX, Zhang WX, Lu JQ, Xu BM, Chen H. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of tacrolimus exposure in Chinese liver transplant patients. *J Clin Pharm Ther*. 2017 Dec;42(6):679-688. Epub 2017 Aug 17. PubMed PMID: 28833329.
39. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M, Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients, *Pharmacogenet Genomics*, 2006 Sep;16(9):659-65, PubMed PMID: 16906020,
40. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E, Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients, *J Am Soc Nephrol*, 2003 Jul;14(7):1889-96, PubMed PMID: 12819250,
41. Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, et al, Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians, *Transplantation*, 2005 Feb 27;79(4):499-502, PubMed PMID: 15729180,
42. Tang JT, Andrews LM, van Gelder T, Shi YY, van Schaik RHN, Wang LL and Hesselink DA, Pharmacogenetic aspects of the use of tacrolimus in renal transplantation: recent developments and ethnic considerations, *Expert Opin, Drug Metab, Toxicol*, 2016 May;12(5):555-65, PubMed PMID: 27010623,
43. Yu X, Xie H, Wei B, Zhang M, Wang W, Wu J, et al, Association of MDR1 gene SNPs and haplotypes with the tacrolimus dose requirements in Han Chinese liver transplant recipients, *PLoS One*, 2011;6(11):e25933, PMID: 22110582
44. Ayrton A, Morgan P, Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion, *Xenobiotica*, 2001 Aug-Sep;31(8-9):469-97, Review, PubMed PMID: 11569523,

45. Kim IW, Noh H, Ji E, Han N, Hong SH, Ha J, et al, Identification of factors affecting tacrolimus level and 5-year clinical outcome in kidney transplant patients, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2012 Oct;111(4):217-23, PMID: 22469198,
46. Shi XJ, Geng F, Jiao Z, Cui XY, Qiu XY, Zhong MK, Association of ABCB1, CYP3A4*18B and CYP3A5*3 genotypes with the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Chinese subjects: a population pharmacokinetic analysis, *J Clin Pharm Ther*, 2011 Oct;36(5):614-24, PMID: 21916909,
47. Santoro A, Felipe CR, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO, Struchiner CJ, Ojopi EB, et al, Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in Brazilian renal transplant patients, *Pharmacogenomics*, 2011 Sep;12(9):1293-303, PMID: 21806386,
48. Hawwa AF, McKiernan PJ, Shields M, Millership JS, Collier PS, McElnay JC, Influence of ABCB1 polymorphisms and haplotypes on tacrolimus nephrotoxicity and dosage requirements in children with liver transplant, *Br J Clin Pharmacol*, 2009 Sep;68(3):413-21, PMID: 19740399
49. L3pez-Montenegro Soria MA, Kanter Berga J, Beltr3n Catal3n S, Milara Pay3 J, Pallard3 Mateu LM, Jim3nez Torres NV, Genetic polymorphisms and individualized tacrolimus dosing, *Transplant Proc*, 2010 Oct;42(8):3031-3, PMID: 20970601,
50. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockm3ller J, John A, et al, Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000 Mar 28;97(7):3473-8, PubMed PMID: 10716719; PubMed Central PMCID: PMC16264,
51. Agrawal V, Huang N, Miller WL, Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19, *Pharmacogenet Genomics*, 2008 Jul;18(7):569-76 PMID: 18551037,
52. Murakami M, [Rupture of renal arterial aneurysm in a pregnant patient], Masui, 1993 Sep;42(9):1367-70, Japanese, PubMed PMID: 8230729,

53. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR, The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients, *Pharmacogenomics*, 2011 Sep;12(9):1281-91, PMID: 21770725,
54. Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS, Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose, *Drug Metab Dispos*, 2011 Aug;39(8):1433-9, PMID: 21562147
55. Avagraf: EPAR – Scientific Discussion, Europaen Medicines Agency, http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000712/WC500022237.pdf,
56. Delaloye JR, Kassir N, Lapeyraque AL, Alvarez F, Lallier M, Beaunoyer M, Labbé L, Théorêt Y, Litalien C, Limited sampling strategies for monitoring tacrolimus in pediatric liver transplant recipients, *Ther Drug Monit*, 2011 Aug;33(4):380-6, doi: 10.1097/FTD.0b013e318220bc64, PubMed PMID: 21743386.
57. Denhaerynck K, Dobbels F, Cleemput I, Desmyttere A, Schäfer-Keller P, Schaub S, De Geest S. Prevalence, consequences, and determinants of nonadherence in adult renal transplant patients: a literature review. *Transpl Int*. 2005Oct;18(10):1121-33. Review. PubMed PMID: 16162098.
58. Dobbels F, Ruppert T, De Geest S, Decorte A, Van Damme-Lombaerts R, Fine RN. Adherence to the immunosuppressive regimen in pediatric kidney transplant recipients: a systematic review. *Pediatr Transplant*. 2010 Aug;14(5):603-13. doi: 10.1111/j.1399-3046.2010.01299.x. Review. PubMed PMID: 20214741.
59. Montini G, Ujka F, Varagnolo C, Ghio L, Ginevri F, Murer L, Thafam BS, Carasi C, Zacchello G, Plebani M. The pharmacokinetics and immunosuppressive response of tacrolimus in paediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol*. 2006May;21(5):719-24. PubMed PMID: 16550361.
60. Ihara H, Shinkuma D, Ichikawa Y, Nojima M, Nagano S, Ikoma F. Intra- and interindividual variation in the pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in kidney transplant recipients importance of trough level as a practical indicator. *Int J Urol*. 1995 Jul;2(3):151-5. PubMed PMID: 8536129.

61. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 1995 Dec;29(6):404-30. Review. PubMed PMID: 8787947.
62. Barraclough KA, Isbel NM, Johnson DW, Campbell SB, Staatz CE. Once- versus twice-daily tacrolimus: are the formulations truly equivalent? *Drugs.* 2011 Aug 20;71(12):1561-77. doi: 10.2165/11593890-000000000-00000. Review. PubMed PMID: 21861541.
63. Iaria G, Sforza D, Angelico R, Toti L, de Luca L, Manuelli M, Bellini I, Manzia TM, Anselmo A, Tisone G. Switch from twice-daily tacrolimus (Prograf) to once-daily prolonged-release tacrolimus (Advagraf) in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2011 May;43(4):1028-9. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.01.130. PubMed PMID: 21620043.
64. Beckebaum S, Iacob S, Sweid D, Sotiropoulos GC, Saner F, Kaiser G, Radtke A, Klein CG, Erim Y, de Geest S, Paul A, Gerken G, Cicinnati VR. Efficacy, safety, and immunosuppressant adherence in stable liver transplant patients converted from a twice-daily tacrolimus-based regimen to once-daily tacrolimus extended-release formulation. *Transpl Int.* 2011 Jul;24(7):666-75. doi:10.1111/j.1432-2277.2011.01254.x. PubMed PMID: 21466596.
65. Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation.* 1999 Jul 15;68(1):55-62. PubMed PMID: 10428267.
66. Delaloye JR, Kassir N, Lapeyraque AL, Alvarez F, Lallier M, Beaunoyer M, Labbé L, Théorêt Y, Litalien C. Limited sampling strategies for monitoring tacrolimus in pediatric liver transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2011 Aug;33(4):380-6. doi: 10.1097/FTD.0b013e318220bc64. PubMed PMID: 21743386.
67. Zhao W, Fakhoury M, Baudouin V, Maisin A, Deschênes G, Jacqz-Aigrain E. Limited sampling strategy for estimating individual exposure of tacrolimus in

- pediatric kidney transplant patients. *Ther Drug Monit.* 2011 Dec;33(6):681-7. doi: 10.1097/FTD.0b013e318235d067. PubMed PMID: 22011724.
68. Barraclough KA, Isbel NM, Kirkpatrick CM, Lee KJ, Taylor PJ, Johnson DW, Campbell SB, Leary DR, Staatz CE. Evaluation of limited sampling methods forestimation of tacrolimus exposure in adult kidney transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Feb;71(2):207-23. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03815.x. PubMed PMID: 21219401; PubMed Central PMCID: PMC3040541.
69. Bouamar R, Shuker N, Hesselink DA, Weimar W, Ekberg H, Kaplan B, Bernasconi C, van Gelder T. Tacrolimus predose concentrations do not predict the risk of acute rejection after renal transplantation: a pooled analysis from three randomized-controlled clinical trials(†). *Am J Transplant.* 2013 May;13(5):1253-61. doi: 10.1111/ajt.12191. PubMed PMID: 23480233.
70. Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellinghen C, Van Kerckhove V, et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation.* 2005 Oct 15;80(7):977-84. PubMed PMID: 16249748.
71. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 Sep;16(9):659-65. PubMed PMID: 16906020.
72. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):383-91. PMID: 11279519.
73. Elens L, Hesselink DA, Bouamar R, Budde K, de Fijter JW, De Meyer M, Mourad M, Kuypers DR, Haufroid V, van Gelder T, van Schaik RH. Impact of POR*28 on the Pharmacokinetics of Tacrolimus and Cyclosporine a in Renal Transplant Patients. *Ther Drug Monit.* 2013 Sep 20. PMID: 24061445.
74. Ji E, Choi L, Suh KS, Cho JY, Han N, Oh JM. Combinational effect of intestinal and hepatic CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in recipients of

- living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2012 Oct 27;94(8):866-72. doi: 10.1097/TP.0b013e318263700a. PubMed PMID: 22992768; PubMed Central PMCID: PMC3478502.
75. Rahsaz M, Azarpira N, Nikeghbalian S, Aghdaie MH, Geramizadeh B, Moini M, Banihashemi M, Darai M, Malekpour Z, Malekhosseini SA. Association between tacrolimus concentration and genetic polymorphisms of CYP3A5 and ABCB1 during the early stage after liver transplant in an Iranian population. *Exp Clin Transplant*. 2012 Feb;10(1):24-9. PubMed PMID: 22309416.
76. Muraki Y, Usui M, Isaji S, Mizuno S, Nakatani K, Yamada T, Iwamoto T, Uemoto S, Nobori T, Okuda M. Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients. *Ann Transplant*. 2011 Oct-Dec;16(4):55-62. PubMed PMID: 22210422.
77. Rong G, Jing L, Deng-Qing L, Hong-Shan Z, Shai-Hong Z, Xin-Min N. Influence of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2010 Nov;42(9):3455-8. PMID: 21094796.
78. Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica*. 2001 Aug-Sep;31(8-9):469-97. Review. PubMed PMID: 11569523.
79. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics*. 2011 Sep;12(9):1281-91. PMID: 21770725.
80. Gijzen VM, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, Nulman I, Koren G, de Wildt SN. P450 Oxidoreductase *28 (POR*28) and Tacrolimus Disposition in Pediatric Kidney Transplant Recipients-A Pilot Study. *Ther Drug Monit*. 2013 Oct 1.
81. Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the

interindividual variations in warfarin maintenance dose. Drug Metab Dispos. 2011 Aug;39(8):1433-9. PMID: 21562147

82. Irene Dapia, Aleksandra Tabakov, Laura Espinosa Román, Lucía Díaz, Pedro Arias Lajara, Marta Melgosa, Angel Melgar, Carlota Fernández, Alicia Herranz Estellés, Pablo Lapunzina, Alberto M. Borobia, Antonio J. Carcas. Effect of the CYP3A5, CYP3A4, CYP3A7, ABCB1, POR and NR1/2 genes in the pharmacokinetics of tacrolimus in a pediatric cohort with stable serum concentrations after renal transplantation: study protocol. IBJ Clinical pharmacology 2017 January Vol 1 issue 1

ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS

Conversion From Prograf to Advagraf in Adolescents With Stable Liver Transplants: Comparative Pharmacokinetics and 1-Year Follow-Up

Antonio J. Carcas-Sansuán,^{1,2} Loreto Hierro,³ Gonzalo N. Almeida-Paulo,² Esteban Frauca,³ Hoi Yan Tong,^{1,2} Carmen Díaz,³ Enrique Piñana,^{1,2} Jesús Frías-Iniesta,^{1,2} and Paloma Jara³

¹Clinical Pharmacology Service, La Paz University Hospital, Madrid, Spain; ²Department of Pharmacology, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain; and ³Department of Pediatric Hepatology and Transplantation, La Paz Children's Hospital, Madrid, Spain

The recommended dose of Advagraf for conversion from Prograf is considered to be 1:1 on a milligram basis. However, the long-term equivalence of Prograf and Advagraf has been questioned. The relative bioavailability of Advagraf and Prograf was evaluated in a single-center, open-label study of Prograf-to-Advagraf conversion in 20 patients, ranging in age from 12 to 18 years, who had a stable liver transplant and were receiving Prograf. After the supervised administration of Prograf for 7 days, the patients were converted to Advagraf. On days 7 and 14, serial blood samples were obtained for tacrolimus determinations. The pharmacokinetic parameters were calculated with a noncompartmental approach, and the relative bioavailability of both formulations was calculated according to standard statistical methods. Polymorphisms in cytochrome P450 3A5 (rs776746), adenosine triphosphate-binding cassette B1 (rs1045642), POR*28 (rs1057868), and POR (rs2868177) were determined with standard methods. The clinical and analytical data from a 1-year follow-up period were collected for all patients 30, 90, 180, and 360 days after conversion. The mean ratios for C_{\max} and AUC_{0-24} were 96.9 (90% confidence interval = 85.37–110.19) and 100.1 (90% confidence interval = 90.8–112.1), respectively. No relationship was found between the patients' genotypes and the pharmacokinetic tacrolimus values. During the follow-up, biochemical parameters (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, bilirubin, cystatin C, and creatinine) did not change significantly; 3 patients presented with relevant clinical events, but no event was considered to be related to tacrolimus. A decrease in tacrolimus blood levels and an increase in dose/level ratios were observed 3 and 6 months after conversion, but they returned to basal levels by month 12. In conclusion, conversion from Prograf to Advagraf with a 1:1 dose equivalence is appropriate as an initial guideline. Our 1-year follow-up showed a transient decrease in tacrolimus levels, so closer monitoring of tacrolimus levels may be required after conversion. *Liver Transpl* 19:1151–1158, 2013. © 2013 AASLD.

Received April 1, 2013; accepted July 3, 2013.

Nonadherence to treatment has been determined to be a significant factor that may contribute to adverse outcomes for various transplants.¹ In our experience,

this nonadherence particularly affects afternoon and night doses, and it is most evident in the pediatric population: 50% of children receiving a solid organ

Abbreviations: ABCB1, adenosine triphosphate-binding cassette B1; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; C_{\max} , maximum concentration; C_{\min} , minimum concentration; C_0 , concentration at zero time; C_{12} , concentration at 12 hours; C_{24} , concentration at 24 hours; AUC, area under the curve; AUC_{0-24} , area under the curve from 0 to 24 hours; Cl_{oral} , apparent oral clearance; $t_{1/2}$, half-life; CYP, cytochrome P450; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase.

The authors thank Astellas Pharma for its financial support for the tacrolimus determination and the payment of trial insurance. Astellas Pharma did not participate in the design, development, or analysis of the study or in the writing of this article, and the investigators did not receive any other grant for their participation in this trial.

Address reprint requests to Antonio J. Carcas-Sansuán, M.D., Ph.D., Department of Pharmacology, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Paseo de la Castellana 261, Madrid, Spain 28046. E-mail: antonio.carcas@uam.es

DOI 10.1002/lt.23711

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

LIVER TRANSPLANTATION.DOI 10.1002/lt. Published on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases

transplant consider a regimen of 2 daily doses inconvenient.² Sudan et al.³ found that nonadherence to treatment may be the third most common cause of late mortality in pediatric liver transplant patients. In addition, Weng et al.⁴ suggested that a single daily dose would improve treatment adherence and, consequently, graft persistence in all patients and particularly in the pediatric population.⁴

Advagraf is a once daily tacrolimus formulation, and the conversion from Prograf to Advagraf has been implemented widely in the clinical setting over the past few years with the objective of improving adherence. De novo treatment with Advagraf has been found to have efficacy similar to that of the twice daily formulation. According to the recommendations of the manufacturer and the information sheets from the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency, the equivalent dosage for Prograf and Advagraf should be 1:1 on a milligram basis. However, recent conversion and de novo studies have found that the disposition of tacrolimus may be lower after the use of Advagraf than after Prograf,⁵⁻⁷ and this puts the long-term bioequivalence of Prograf and Advagraf into question.⁸

The present study evaluated the relative bioavailability of Advagraf and Prograf formulations in liver transplant patients between 12 and 18 years of age, compared patients' genotypes with tacrolimus pharmacokinetics, and analyzed 1 year of follow-up after conversion.

PATIENTS AND METHODS

Study Design

This was a single-center, open-label study of the conversion of tacrolimus treatment from Prograf to Advagraf in patients who were 12 to 18 years old with a stable liver transplant. The main objective was to evaluate the relative bioavailability of the 2 formulations. After the completion of the study, data from a 1-year follow-up period were collected to evaluate the kinetic and clinical changes that occurred during this period.

The study was performed at La Paz University Hospital, a tertiary hospital of reference for pediatric liver transplantation. The study protocol was approved by the ethics committee of La Paz University Hospital and by the Spanish Drug Regulatory Agency, and the study was registered at European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials (2008-001440-39).

Patients

Liver transplant patients between 12 and 18 years of age who had normal graft function [aspartate aminotransferase (AST) level = 29 ± 7 U/L, alanine aminotransferase (ALT) level = 25 ± 10 U/L, total bilirubin level = 0.5 ± 0.2 mg/dL] and were on a stable treatment with tacrolimus were selected for this trial. The tacrolimus treatment was considered

stable if the patient had received a stable dose of tacrolimus for the last 2 controls (<20% variation) and there had been no changes in concomitant drugs that could modify the tacrolimus kinetics for the last 15 days. Patients were required to be able to understand the study's objectives, procedures, and treatment indications. Parents and caretakers were required to have the ability to adequately control the administration of Prograf and Advagraf as established in the protocol. Patients who had experienced a rejection episode in the previous 90 days were excluded from the study.

Sample Size

The number of required subjects was calculated from a similar conversion study, the European public assessment report for Advagraf (code 02-0-131), which was performed with adults with heart and kidney transplantation.⁹ The mean AUC₀₋₂₄ (Area under the curve of tacrolimus concentrations from 0 to 24 hours) values in the steady state for Advagraf and Prograf were 200.7 ± 57.5 and 206.6 ± 58.4 ng/mL·h, respectively. For a difference between formulations of 5%, a power of 80%, and a 90% confidence interval, the number of patients required was determined to be 18. According to data from Heffron et al.,¹⁰ the number of patients needed was 15. Considering these 2 references and taking into account possible withdrawals, we established the study size at 20 patients.

Study Development

The patients were included after they met the selection criteria, were informed about the study design and procedures, and gave written informed consent. They were administered Prograf with monitoring for 1 week in accordance with the manufacturer's recommendations and under parental supervision; a treatment card was used on which the drug dose and the timing of its administration were noted during these 7 days. The total daily dose of Prograf was administered in 2 equal doses. After this week of treatment, each patient was admitted to the hospital to begin the kinetic study. On the first day, venous access was canalized for blood extractions, and a blood sample was obtained for the basal measurement of tacrolimus. Subsequently, the patients received a Prograf dose between 8:00 and 9:00 AM with 200 mL of water. The blood sampling then followed a scheduled timetable (see the following section). Breakfast was scheduled at 10:00 AM, a standard lunch was served at 1:00 PM, and dinner was served at 7:00 PM. Twelve hours after the morning administration, the second dose of Prograf was administered, and blood extractions continued until the next morning. On the second morning, the patients received a new administration control card and a new treatment protocol, and they started Advagraf once a day at the same dose (a 1:1 conversion ratio). After 7 days of the supervised

TABLE 1. Demographic and Clinical Characteristics of the Patients (n = 20)

Sex: male/female (n/n)	9/11
Race (n)	
White	17
Black	1
Hispanic	2
Age (years)*	13.9 ± 1.66 (12–17)
Weight (Kg)*	47.9 ± 8.8 (29.4–67.5)
Height (cm)*	155.1 ± 8.28 (139–169)
Pretransplant liver disease (n)	
Biliary atresia	9
Alpha-1-antitrypsin deficiency	3
Budd-Chiari syndrome	1
Acute liver failure	3
Cystic fibrosis	1
Alagille syndrome	1
Bile salt export pump deficiency	1
Maple syrup urine disease	1
Graft type (n)	
Whole liver	10
Split liver	1
Reduced size	8
Living donor	1
Biliary reconstruction (n)	
Roux-en-Y loop	17
End to end	3
Total daily dose of Prograf at baseline (mg)	
Mean ± standard deviation	4.8 ± 1.70
Median (range)	4.50 (3–10)
Time from transplantation (years)	
Median	11.70
Range	1.4–15.5

NOTE: The main diagnoses that motivated liver transplantation were biliary atresia, alpha-1-antitrypsin deficiency, Budd-Chiari syndrome, acute liver failure, cystic fibrosis, Alagille syndrome, bile salt export pump deficiency, and maple syrup urine disease.

*The data are presented as means and standard deviations (with ranges in parentheses).

administration of Advagraf, patients were again admitted to the hospital, and the procedure that had been followed on the first day after the week of Prograf treatment was repeated. Patients were discharged with a prescription for Advagraf, and regular follow-up visits were scheduled.

Concomitant drugs that patients were taking were not modified during the pharmacokinetic study.

Timing of Blood Extractions for Pharmacokinetic Analysis

Blood samples were extracted for pharmacokinetic analysis just before the administration of the morning dose and at the following times: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4,

6, 8, 12, 12.5, 13, 14, 15, 16, 18, 20, and 24 hours after the administration of Prograf (at 0 and 12 hours) and 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 15, and 24 hours after the administration of Advagraf.

Tacrolimus Blood Measurements

Samples were collected in duplicate tubes with ethylene diamine tetraacetic acid and were frozen at -20°C until the analysis. A homogeneous enzyme immunoassay (an antibody-conjugated magnetic immunoassay) on a Dimension platform (Siemens Health Care Diagnostic, Ltd., Frimley, United Kingdom) was used. The lower limit of quantification was 2 ng/mL, and the upper limit of quantification was 30 ng/mL. Results greater than 30 ng/mL were diluted to obtain concentrations between 2 and 30 ng/mL.

Pharmacokinetic and Statistical Analysis

The kinetic data analysis was performed according to a noncompartmental model. AUC_{0-24} was calculated with the trapezoidal rule, and the apparent oral clearance (Cl_{oral}) was calculated as the dose divided by AUC_{0-24} . C_{max} (maximum concentration), C_0 (concentration at zero time), C_{12} (concentration at 12 hours), and T_{max} (time to maximum concentration) were obtained directly from raw data. The fluctuation was calculated as follows: $(C_{\text{max}} - C_{24})/C_{24} \times 100$, being C_{24} the concentration at 24 hours after dosing.

To compare kinetic parameters [the area under the curve (AUC) and C_{max}] and to evaluate the relative bioavailability of the 2 formulations over a 24-hour period, we used an analysis of variance and calculated the standard 90% confidence interval. Calculations were made after logarithmic transformation. The pharmacokinetic and bioequivalence statistical analysis was performed with WinNonlin 2.0 (Pharsight Corp., Cary, NC). Differences in the tacrolimus concentrations at various time points and during fluctuations were determined with a *t* test. To calculate the fluctuation in Prograf, the 24-hour period was divided into 2 parts (with 12 hours between each dose), and it was calculated between C_{max} of each period and the tacrolimus concentrations at 12 or 24 hours as appropriate. The Advagraf fluctuation was calculated between C_{max} and the tacrolimus concentration at 24 hours.

Genotyping Assays

Genomic DNA was isolated from peripheral blood with a commercial extraction kit (QuickGene DNA Whole Blood Kit S, Fujifilm Life Science, Singapore), and it was amplified by polymerase chain reaction with the Applied Biosystems 7900HT fast real-time polymerase chain reaction system (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The assay numbers for the genotyping assays from Applied Biosystems were as follows: C_26201809_30 for rs776746, C_7586657_20 for

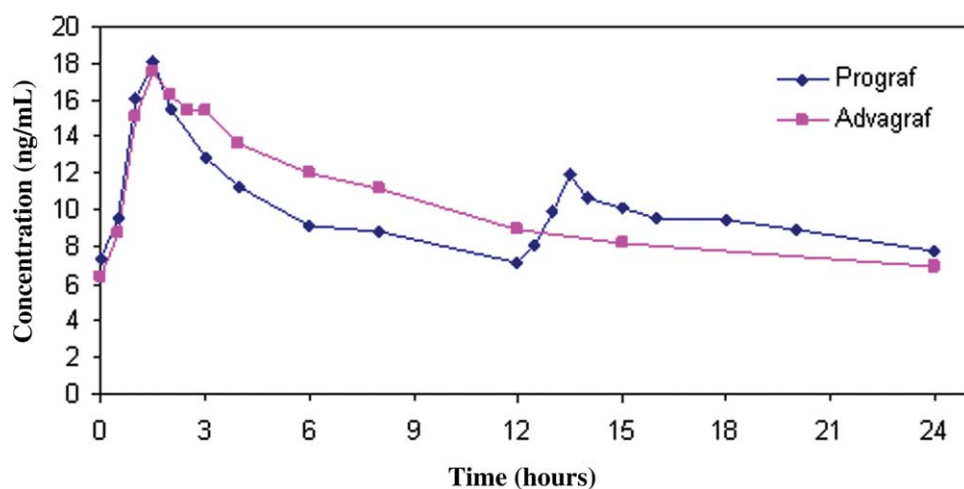


Figure 1. Mean concentrations for each formulation.

rs1045642, C__8890131_30 for rs1057868, and C__11213971_10 for rs2868177. Amplifications were performed in a 384-well format.

One-Year Follow-Up

After the completion of the pharmacokinetic study, patients were followed at the clinic as usual. Analytical data nearest to follow-up days 30, 90, 180, and 360 were recovered from the computerized laboratory system available at our hospital. Clinical records were also reviewed, and all relevant clinical events, including rejection episodes, graft dysfunction, and hospitalizations, were noted. Three patients presented with clinical events that required hospitalization but were not considered related to the treatment (see the Results section). To prevent interference, the analytical values of these concurrent episodes were disregarded because in all cases these values returned to previous figures once they were resolved. The tacrolimus doses, tacrolimus concentrations, and analytical values (creatinine, cystatin C, ALT, AST, bilirubin, and hemoglobin) at the time of inclusion in the study were compared with values at each predefined time (30, 90, 180, and 360 days) with the Wilcoxon test; the correction of the alpha error for multiple comparisons was performed with the Bonferroni method (the final alpha error was set at 0.0125).

RESULTS

Twenty patients were recruited as established in the protocol. Their demographic and clinical characteristics are detailed in Table 1.

All patients completed the pharmacokinetic study as determined by the protocol. There were no analytical alterations considered to be clinically relevant. Two patients (one for each formulation) reported self-limited diarrhea during the inter-admission period.

All patients had data available for the 1-year follow-up.

Concomitant Treatment During the Pharmacokinetic Study

All patients had tacrolimus as their main immunosuppressive agent. Nineteen patients were taking prednisolone at an average dose of 4 mg every other day. Four patients also received mycophenolate mofetil with a dose range of 11.5 to 25 mg/kg/day. Other drugs included clotrimazole (18 patients), tediprima (1 patient), magnesium (10 patients), ursodeoxycholic acid (3 patients), valganciclovir (2 patients), and omeprazole (2 patients). No changes in concomitant drugs or their doses were made during the pharmacokinetic study.

Pharmacokinetic Results and Relative Bioavailability of Both Formulations

Figure 1 displays the mean concentrations of tacrolimus after Prograf and Advagraf administration. Primary pharmacokinetic parameters reflecting the drug disposition (C_{\max} and AUC_{0-24}) were similar for the 2 formulations (see Table 2).

In Figure 1, we can also observe that the mean C_{\max} value for the first dose of Prograf was higher than the value for the second dose. In all but 2 patients, C_{\max} for Prograf was obtained from the morning dose. It should also be noted that C_0 , C_{12} , and C_{24} were all quite similar, although C_{12} was somewhat lower for Prograf, as was expected. The fluctuation of tacrolimus concentrations between doses was larger for Prograf versus Advagraf (see Table 2).

The terminal half-life $t_{1/2}$ values were also similar for the 2 formulations: 19.46 hours (13.63 hours) for Prograf and 22.87 hours (10.54 hours) for Advagraf. The median for T_{\max} was the same for the 2 formulations (1.5 hours).

TABLE 2. Main Pharmacokinetic Parameters for Tacrolimus After Prograf and Advagraf Administration

Parameter	Prograf	Advagraf	Ratio (90% Confidence Interval)
C_{\max} (ng/mL)	19.52 \pm 5.50	18.96 \pm 5.52	96.9 (85.37-110.19)
AUC ₀₋₂₄ (ng/mL·h)	234.86 \pm 66.99	238.50 \pm 68.76	100.1 (90.8-112.1)
T_{\max} (hours)	1.5 (1-13.5)	1.5 (1-4)	
Cl _{oral} (L·hour)	21.4 \pm 8.46	20.77 \pm 7.02	
C_0 (ng/mL)	7.09 \pm 3.97	7.09 \pm 3.89	
C_{12} (ng/mL)	7.08 \pm 2.38	8.88 \pm 2.72*	
C_{24} (ng/mL)	7.82 \pm 2.96	6.81 \pm 2.49	
Fluctuation (%)			
0-12 hours	175.96 \pm 84.90 [†]		
12-24 hours	88.09 \pm 96.20		
0-24 hours	173.72 \pm 99.69	201.48 \pm 124.79	

NOTE: The data are presented as means and standard deviations for all parameters except T_{\max} (whose values are presented as medians and ranges).

* $P = 0.03$ for Prograf versus Advagraf.

[†] $P = 0.004$ for 0 to 12 hours versus 12 to 24 hours.

TABLE 3. Patients' Genotype Frequencies for CYP3A5, ABCB1, and 2 Analyzed PORs

Variant	Genotype	n (Frequency)	95% Confidence Interval
CYP3A5 rs776746	*1/*1	0 (0)	0-0.2005
	*1/*3	4 (0.2)	0.0661-0.4427
	*3/*3	16 (0.8)	0.5573-0.9339
ABCB1 rs1045642	CC	9 (0.45)	0.2383-0.6795
	CT	7 (0.35)	0.1631-0.5905
	TT	4 (0.2)	0.0661-0.4427
POR*28 rs1057868	CC	9 (0.45)	0.2383-0.6795
	CT	8 (0.4)	0.1998-0.6359
	TT	3 (0.15)	0.0396-0.3886
POR rs2868177	AA	7 (0.35)	0.1631-0.5905
	AG	11 (0.55)	0.3205-0.7617
	GG	2 (0.1)	0.0175-0.3313

The interindividual coefficients of variation for the primary disposition parameters were also similar for the 2 formulations: 28.20% and 28.50% for C_{\max} and AUC₀₋₂₄, respectively, for Prograf and 29.10% and 28.80% for C_{\max} and AUC₀₋₂₄, respectively, for Advagraf. We found no differences between males and females in AUC₀₋₂₄ or C_{\max} when adjustments were made by the administered dose per kilogram.

A finding worth highlighting is the difference in the concentration profiles of Prograf between the morning and evening doses, which reflects the circadian rhythm in the disposition of tacrolimus. C_{\max} was 18.87 \pm 5.96 ng/mL after the morning dose and 13.19 \pm 3.89 ng/mL after the evening dose. We found no differences in the tacrolimus half-life with the morning dose of Prograf versus the evening dose.

When the statistical analysis of bioequivalence was performed for AUC₀₋₂₄ and C_{\max} , the 90% confidence intervals for the Advagraf/Prograf ratio were 90.8 to 112.1 and 85.37 to 110.19, respectively. This finding means that the formulations can be considered bioequivalent according to the requirements established by international regulatory agencies.^{11,12}

Genetic Results

The frequency of patients with each genotype was typical for a white population (Table 3). The more frequent genotypes were cytochrome P450 CYP3A5 *3/*3 (0.80), adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) CC (0.45), POR rs2868177 AG (0.55), and POR*28 CC (0.45). In our population, we found no patients with CYP *1/*1 expression. Our population followed the Hardy-Weinberg principle. No relationship was found between patients' genotypes and the pharmacokinetic values.

One-Year Follow-Up

By the end of the follow-up, all patients who had participated in the study were still living. During the follow-up, no adherence problems and no episodes of rejection were detected. At month 9 of the follow-up, 1 patient presented with graft dysfunction due to hepatic artery thrombosis that had occurred during an episode of severe diarrhea with dehydration. This patient recovered completely after thrombectomy with

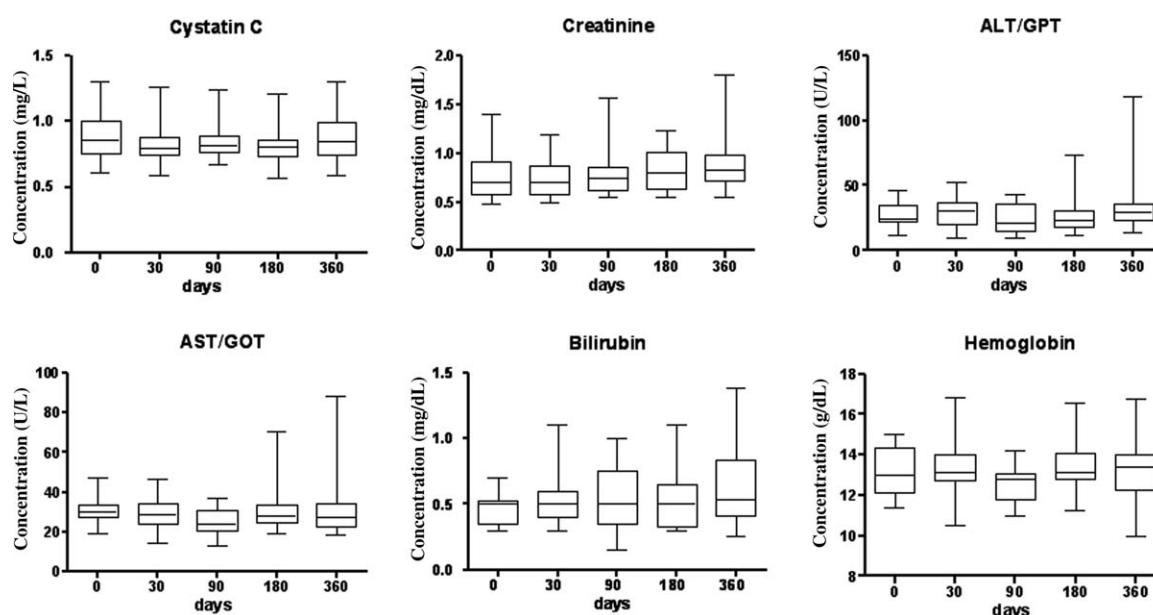


Figure 2. Evolution of the main analytical parameters. The data are presented as 95% box plots. The lines in the boxes represent the median values, the boxes represent the 25th and 75th percentiles, and the outer lines represent the 5th and 95th percentiles. No significant differences ($P < 0.05$) in comparison with time 0 were found for any parameter at any time of follow-up.

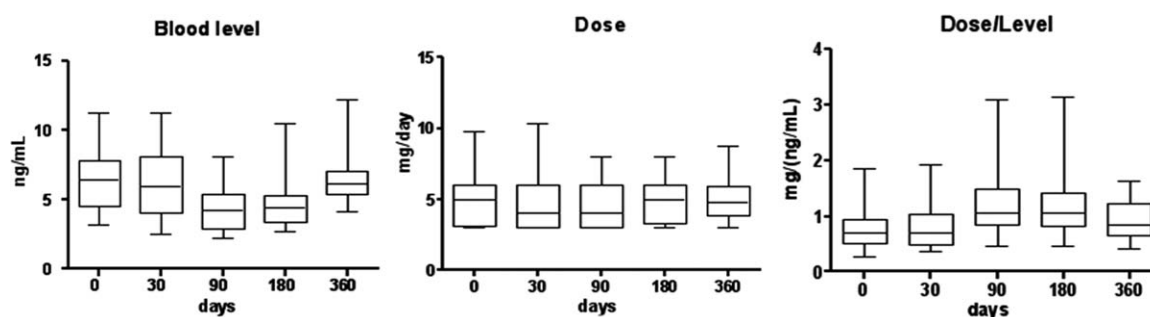


Figure 3. Tacrolimus blood levels, doses, and dose/level ratios during the first year after the conversion from Prograf to Advagraf. The lines in the boxes represent the median values, the boxes represent the 25th and 75th percentiles, and the outer lines represent the 5th and 95th percentiles. Significant differences were found for tacrolimus level between 0 and 90 days ($P < 0.002$) and 180 days ($P = 0.01$) and for dose/level ratio between 0 and 90 days ($P = 0.02$) and 180 days ($P = 0.008$).

intra-arterial urokinase and subsequent angioplasty. Two cases suffered uncomplicated influenza A, 1 patient developed warts, and 1 patient with cystic fibrosis needed hospital admission because of a lung infection. Routine Epstein-Barr virus DNA quantitation detected just 1 case with values greater than 2×10^4 copies/mL. No posttransplant lymphoproliferative disorders occurred.

Figure 2 shows the relevant analytical parameters at the start of the study and during the 1-year follow-up. There were no significant changes in the mean hepatic enzyme levels during this period; 2 patients had transient levels of ALT above the upper limit of normality (the patient suffering hepatic artery thrombosis and the

patient with cystic fibrosis). Cystatin C and creatinine levels in plasma revealed no significant changes in renal function (Fig. 2). Changes in the administered tacrolimus dose and the concentration levels are displayed in Fig. 3. The tacrolimus level decreased significantly from 6.43 ng/mL before the conversion to 4.25 ng/mL (range = 2.2–8.2 ng/mL) at 90 days and 4.4 ng/mL (range = 2.7–10.6 ng/mL) at 180 days, whereas the dose/level ratio for tacrolimus (and the dose/level ratio adjusted by weight) showed an increase at the same time points. These parameters tended to return to basal levels by month 12. The dose/level/weight ratio was also evaluated, but its values were similar to those for the dose/level ratio, and the distribution was also similar.

DISCUSSION

Among adult liver transplant patients, the rate of non-adherence to immunosuppressive drugs ranges from 15% to 40%, and the rate is nearly 4 times higher among pediatric and adolescent patients.¹³ A once daily tacrolimus formulation, Advagraf, is being adopted in clinical practice and was developed with the aim of improving patient adherence because non-adherence to immunosuppressant treatment has been cited as a major cause of acute and chronic rejection, preventable graft loss, and mortality in patients undergoing solid organ transplantation.¹⁴

On the basis of our results and as previously reported for adult and pediatric patients, Advagraf can be considered truly bioequivalent to Prograf with a very close ratio, a narrow confidence interval, and adequate strength (81% for C_{\max} and 96% for AUC_{0-24}); therefore, the formulations are interchangeable from a pharmacokinetic perspective.

The pharmacokinetic properties of tacrolimus did not reveal differences with respect to sex, CYP3A4, CYP3A5, or P-glycoprotein polymorphisms. The relatively small patient population of this study may have limited our ability to detect a biologically meaningful difference. The donor genotype may be more relevant for tacrolimus metabolism,¹⁵⁻¹⁷ and our genotyping was more likely to be a reflection of the recipient genotype. The known effects of circadian rhythm on tacrolimus metabolism¹⁸ may explain higher C_{\max} and AUC values in the morning versus the evening.

From a purely pharmacokinetic point of view, the appropriateness of the conversion from Prograf to Advagraf with a dose ratio of 1:1 is consistent with our data and practically all data published to date.¹⁹ However, the long-term equivalence of the dose after the conversion to Advagraf and the previous Prograf dose has been questioned.¹⁹ In adult liver transplant patients, several reports have described the need to modify the dose after the conversion from Prograf to Advagraf.²⁰⁻²² The decrease in tacrolimus levels is usually between 0.5 and 1 ng/mL and is observed 15 to 30 days after the conversion.

Parallel studies comparing treatment with Prograf and Advagraf in adult de novo liver transplant recipients suggest that patients treated with Advagraf need a somewhat higher dose to maintain the same tacrolimus concentrations.²³

As far as we know, apart from a study by Heffron et al.,¹⁰ no conversion studies on pediatric and adolescent patients with liver transplants have been published; Heffron et al. also reported 1 year of follow-up for this population. The patients included in their study were younger than the patients in our study (the mean difference in age for the 2 samples was 6 years), but their results for the relative bioavailability of the 2 formulations were comparable to our results. These authors reported that during the first year after conversion, no cases of rejection, Advagraf discontinuation, graft loss, or death were recorded, but detailed follow-up data for tacrolimus doses and concentra-

tions and for clinical laboratory values were not provided. Tacrolimus levels were reported at the 1-year follow-up without noticeable differences [there was a small difference in the means (4.90 ± 2.44 ng/mL at 1 year versus 5.55 ± 2.61 ng/mL at the baseline), but there was no difference in the median tacrolimus levels (5.2 versus 5.1 ng/mL)]. Our raw data, in accordance with some studies in adults (both renal transplant patients and liver transplant patients), show that conversion brings a significant decrease in tacrolimus trough levels at 3 and 6 months, but the levels tend to return to basal concentrations during the 1-year follow-up. In addition to looking at tacrolimus levels and doses, we calculated the dose/level ratios, which reflected the disposition of tacrolimus, and we observed that the changes were concordant with the changes in the tacrolimus level, which were not significant at the 1-year follow-up. This tendency toward normalization during follow-up has been observed by others,^{20,22} although the timing can differ from one study to another. The reasons for these changes are unclear because of the uncontrolled and longitudinal nature of the design of these studies, but they are probably related to several factors. The first could be a regression to the mean phenomenon usually seen in this kind of study. Also, we must consider that experience tells us that the intra-individual variability of C_{\min} minimum concentration in clinical practice is quite high and that minor dose modifications are frequent. Finally, the abnormal nature of the parameter may influence the result, as we can see in the study performed by Heffron et al., in which the mean and median at 1 year were somewhat different (something not observed in our study). For the purpose of therapeutic drug monitoring, the trough levels of tacrolimus after Advagraf administration should be interpreted in the same way in which they are after Prograf use; the C_{\min} minimum concentration and AUC values are very similar for the 2 formulations. The data from the literature on trough tacrolimus levels after Advagraf administration and total exposure (AUC) are scarce but suggest that they would be similar to those after Prograf administration.²⁴ Therefore, we must take into account the transient decrease in tacrolimus levels that we observed and closely monitor these levels after conversion, particularly when the target concentrations are in the lower range. In any case, the studies published to date have not reported a deterioration in the clinical status of patients after conversion because of the low relevance of this change or because therapeutic drug monitoring allows dose adjustments that can correct the minor changes in tacrolimus levels associated with conversion. In our study, during the year of follow-up, biochemical parameters (mainly associated with hepatic and renal function) did not change significantly; 3 patients presented with relevant clinical events, but none were considered to be related to tacrolimus.

In conclusion, the confidence intervals for the AUC_{0-24} and C_{\max} ratios for the 2 tacrolimus formulations are well within the interval of 80 to 125 and,

therefore, satisfy the criteria required by health authorities for bioequivalence. We conclude that Prograf conversion to Advagraf with a 1:1 dose equivalence is appropriate as an initial guideline. Follow-up at 1 year after the formulation conversion shows a decrease in the concentration without significant changes in the dose; although these changes are transient, they suggest the need for closer drug monitoring. This is the first study to present relevant laboratory results regarding hepatic and kidney biochemical parameters. Clinical control of the patient's condition during this period is not adversely affected by the change in the tacrolimus formulation.

REFERENCES

- Butler JA, Roderick P, Mullee M, Mason JC, Peveler RC. Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review. *Transplantation* 2004;77:769-776.
- Fennell RS, Foulkes LM, Boggs SR. Family-based program to promote medication compliance in renal transplant children. *Transplant Proc* 1994;26:102-103.
- Sudan DL, Shaw BW Jr, Langnas AN. Causes of late mortality in pediatric liver transplant recipients. *Ann Surg* 1998;227:289-295.
- Weng FL, Israni AK, Joffe MM, Hoy T, Gaughan CA, Newman M, et al. Race and electronically measured adherence to immunosuppressive medications after deceased donor renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1839-1848.
- de Jonge H, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Reduced C0 concentrations and increased dose requirements in renal allograft recipients converted to the novel once-daily tacrolimus formulation. *Transplantation* 2010;90:523-529.
- Abdulnour HA, Araya CE, Dharnidharka VR. Comparison of generic tacrolimus and Prograf drug levels in a pediatric kidney transplant program: brief communication. *Pediatr Transplant* 2010;14:1007-1011.
- Hougardy JM, Broeders N, Kianda M, Massart A, Madhoun P, Le Moine A, et al. Conversion from Prograf to Advagraf among kidney transplant recipients results in sustained decrease in tacrolimus exposure. *Transplantation* 2011;91:566-569.
- Hougardy JM, de Jonge H, Kuypers D, Abramowicz D. The once-daily formulation of tacrolimus: a step forward in kidney transplantation? *Transplantation* 2012;93:241-243.
- Advagraf: EPAR - Scientific Discussion. European Medicines Agency. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000712/WC500022237.pdf. Accessed July 2013.
- Heffron TG, Pescovitz MD, Florman S, Kalayoglu M, Emre S, Smallwood G, et al. Once-daily tacrolimus extended-release formulation: 1-year post-conversion in stable pediatric liver transplant recipients. *Am J Transplant* 2007;7:1609-1615.
- Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the investigation of bioequivalence. http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf. Published January 20, 2010. Accessed July 2013.
- Food and Drug Administration. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations. Revision 1. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>. Published March 2003. Accessed July 2013.
- Burra P, Germani G, Gnoato F, Lazzaro S, Russo FP, Cillo U, Senzolo M. Adherence in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2011;17:760-770.
- Morrissey PE, Flynn ML, Lin S. Medication noncompliance and its implications in transplant recipients. *Drugs* 2007;67:1463-1481.
- Ji E, Choi L, Suh KS, Cho JY, Han N, Oh JM. Combinational effect of intestinal and hepatic CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in recipients of living donor liver transplantation. *Transplantation* 2012;94:866-872.
- Rahsaz M, Azarpira N, Nikeghbalian S, Aghdaie MH, Geramizadeh B, Moini M, et al. Association between tacrolimus concentration and genetic polymorphisms of CYP3A5 and ABCB1 during the early stage after liver transplant in an Iranian population. *Exp Clin Transplant* 2012;10:24-29.
- Muraki Y, Usui M, Isaji S, Mizuno S, Nakatani K, Yamada T, et al. Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients. *Ann Transplant* 2011;16:55-62.
- Hardinger KL, Park JM, Schnitzler MA, Koch MJ, Miller BW, Brennan DC. Pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients: twice daily versus once daily dosing. *Am J Transplant* 2004;4:621-625.
- Barracough KA, Isbel NM, Johnson DW, Campbell SB, Staats CE. Once- versus twice-daily tacrolimus: are the formulations truly equivalent? *Drugs* 2011;71:1561-1577.
- Beckebaum S, Iacob S, Sweid D, Sotiropoulos GC, Saner F, Kaiser G, et al. Efficacy, safety, and immunosuppressant adherence in stable liver transplant patients converted from a twice-daily tacrolimus-based regimen to once-daily tacrolimus extended-release formulation. *Transpl Int* 2011;24:666-675.
- Saňko-Resmer J, Boillot O, Wolf P, Thorburn D. Renal function, efficacy and safety postconversion from twice-to once-daily tacrolimus in stable liver recipients: an open-label multicenter study. *Transpl Int* 2012;25:283-293.
- Dopazo C, Rodriguez R, Llado L, Calatayud D, Castells L, Ramos E, et al. Successful conversion from twice-daily to once-daily tacrolimus in liver transplantation: observational multicenter study. *Clin Transplant* 2012;26:E32-E37.
- Fischer L, Trunečka P, Gridelli B, Roy A, Vitale A, Valdivieso A, et al. Pharmacokinetics for once-daily versus twice-daily tacrolimus formulations in de novo liver transplantation: a randomized, open-label trial. *Liver Transpl* 2011;17:167-177.
- Woillard JB, de Winter BC, Kamar N, Marquet P, Rostaing L, Rousseau A. Population pharmacokinetic model and Bayesian estimator for two tacrolimus formulations—twice daily Prograf and once daily Advagraf. *Br J Clin Pharmacol* 2011;71:391-402.

Conversion from Prograf to Advagraf in stable paediatric renal transplant patients and 1-year follow-up

Antonio J. Carcas-Sansuán · Laura Espinosa-Román ·
Gonzalo N. Almeida-Paulo · Angel Alonso-Melgar ·
Carmen García-Meseguer · Carlota Fernández-Cambor ·
Nicolás Medrano · Elena Ramirez

Received: 14 May 2013 / Revised: 26 June 2013 / Accepted: 26 June 2013
© IPNA 2013

Abstract

Background The conversion from Prograf to Advagraf on a 1:1 (mg:mg) basis has been questioned in light of the publication of studies showing a decrease in tacrolimus blood concentrations after the administration of Advagraf.

Methods The bioavailability of Prograf and Advagraf was evaluated in an open-label conversion study in 21 stable renal transplant paediatric patients. Serial blood samples

for determining tacrolimus levels were collected during a 24-h period before (on Prograf) and after (on Advagraf) conversion. Tacrolimus pharmacokinetic parameters were calculated using a non-compartmental approach and the relative bioavailability calculated. Clinical and analytical data were obtained at 30, 90, 180 and 360 days after study enrolment.

Results The mean ratio and 90 % confidence interval (CI) for peak plasma drug concentration (C_{max}) and the area under the time–concentration curve during the first 24 h (AUC_{0-24}) were 81.54 (95 % CI 71.6–92.87) and 87.19 (95 % CI 79.91–95.13), respectively. Renal glomerular filtration rate remained stable over the course of the follow-up. Two patients presented clinical events unrelated to tacrolimus. Tacrolimus levels decreased in the first month, the dose/level ratio increased between months 1 and 6 and slight dose adjustments were required during the follow-up period.

Conclusions Our results show that Advagraf bioequivalence cannot be ensured in this population. Significant changes in tacrolimus levels and dose were observed on long-term follow-up.

Trial registry: EudraCT no. 2009-017600-89.

A. J. Carcas-Sansuán (✉) · N. Medrano · E. Ramirez
Clinical Pharmacology Service, University Hospital La Paz, Paseo
de la Castellana, 261, 28046 Madrid, Spain
e-mail: antonio.carcas@uam.es

N. Medrano
e-mail: micomedrano@live.com

E. Ramirez
e-mail: relicena@gmail.com

A. J. Carcas-Sansuán · G. N. Almeida-Paulo · N. Medrano ·
E. Ramirez
Department of Pharmacology, School of Medicine, Autonomous
University of Madrid, Madrid, Spain

G. N. Almeida-Paulo
e-mail: gnapaulo@usal.es

L. Espinosa-Román · A. Alonso-Melgar · C. García-Meseguer ·
C. Fernández-Cambor
Department of Paediatric Nephology, Children's Hospital La Paz,
Madrid, Spain

L. Espinosa-Román
e-mail: lespinosar@salud.madrid.org

A. Alonso-Melgar
e-mail: aamelgar@salud.madrid.org

C. García-Meseguer
e-mail: cgmeseguer@salud.madrid.org

C. Fernández-Cambor
e-mail: carlotam.fernandez@salud.madrid.org

Keywords Bioavailability · Children · Concentrations ·
Pharmacokinetics · Tacrolimus

Introduction

Immunosuppression is required in all types of transplants to prevent graft failure and graft loss. Treatment compliance in immunosuppression is required and must be ensured because nonadherence is potentially a major risk factor for graft failure [1, 2]. Studies have shown that patients who have undergone renal transplantation are more susceptible to medication nonadherence, which may be due to the non-vital nature of the kidneys [3, 4].

Tacrolimus, a potent calcineurin inhibitor, prevents T-cell activation and is used in many organ transplants. The drug was initially developed in a twice-daily oral formulation (Prograf); however, in 2008, Astellas Pharma developed an extended release formulation (Advagraf) as a drug therapy to reduce treatment nonadherence. Based on the recommendations of the manufacturer and the information sheets from the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA), the dose equivalence for Prograf and Advagraf should be 1:1 (mg:mg). These recommendations were confirmed by a number of studies in which similar pharmacokinetics (PK) were found for both formulations, thereby demonstrating to the authors that patients did not require dose adjustments [5, 6]. However, a number of other authors have reported that the bioavailability of tacrolimus after the administration of Advagraf is less than that after the administration of Prograf. These conclusions were based on the results of conversion and “de novo” studies [7–9] and have led to the equivalence of Prograf and Advagraf being questioned [10].

In this study we evaluated the relative bioavailability of Prograf and Advagraf formulations in renal transplant patients aged less than 18 years who had received prior stable treatment with Prograf. We also evaluated the 1-year follow-up of the new treatment (conversion) with Advagraf in terms of PK and clinical changes.

Patients and methods

Patients and study design

This was a single-center, open-label study of tacrolimus treatment conversion from Prograf to Advagraf that included patients with stable renal transplants who were less than 18 years old. The study was conducted at the Hospital La Paz, a referral hospital for paediatric renal transplantation. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Hospital La Paz and the Spanish Agency for Medicines and Health Products and was registered under EudraCT no. 2009-017600-89. All patients provided written informed consent prior to being enrolled in the study.

Each enrolled patient had to fulfil the following inclusion criteria:

- age between 4 and 18 years;
- ability to swallow the medication;
- stable tacrolimus treatment in the last 30 days defined as a variation of <20 % between the dose and blood concentrations of tacrolimus during this period and the non-

administration in the last 15 days of any drug that might change tacrolimus PK;

- a clinical decision to change the patient’s treatment from Prograf to Advagraf;
- ability to understand the procedures and treatment indications;
- parents’ or guardians’ ability to control the patient’s drug intake according to the instructions provided.

The patient sample size was calculated based on a similar conversion study performed on adults with heart and renal transplants [referenced in the European public assessment report on Advagraf (code 02-0-131), on the EMA website (<http://www.ema.europa.eu/ema/>)]. The steady-state area under the concentration–time curve for the first 24 h after drug administration (AUC_{0-24}) for Advagraf and Prograf (mean \pm standard deviation) was 200.7 ± 57.5 and 206.6 ± 58.4 ng/ml/h, respectively. We calculated that 18 patients needed to be enrolled to achieve a 5 % difference in steady-state AUC_{0-24} , a power of 80 % and a 90 % confidence interval (CI). Based on these data and taking possible withdrawals into account, the study size was established at 21 patients.

Study development

The patients were enrolled after meeting the inclusion criteria, being informed of the study design and procedures and providing written informed consent. Patients were administered Prograf in a parent-controlled manner for 1 week. The parents recorded the dose and timing of each drug administration over the course of the week on a treatment card. At the end of the week, the patients were admitted to Hospital La Paz for the first day of the PK study. On the first day, venous access was obtained and blood samples were collected for baseline tacrolimus measurements. The patients then received a dose of Prograf with 200 ml of water between 8:00 a.m. and 9:00 a.m. Blood sampling was then performed following the scheduled timetable (see following section). Breakfast time was scheduled for 11:00 a.m. and a standard meal was served at 1:00 p.m. Twelve hours after the morning administration of Prograf, the second dose of Prograf was administered, and the blood sampling continued until the next morning. Dinner was served at 7:00 pm. The following morning, patients received a new controlled administration card and a new treatment protocol starting with Advagraf once a day, without a washout period. On day 7 of this controlled administration, patients were re-admitted and the procedure conducted on the first day was repeated after the administration of Advagraf. The patients were then sent home to continue the treatment schedule. Regular visits were conducted during the first follow-up year.

None of the concomitant treatments that the patients were taking were modified during the course of the study.

Timing of blood extractions for PK analysis

Blood sampling for PK analysis was performed just before the administration of the morning dose and at the following times: for Prograf at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 12.5, 13, 14, 15, 16, 18, 20 and 24 h after drug administration; for Advagraf at 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 15 and 24 h after drug administration.

Measurements of tacrolimus levels in blood

Blood samples were collected in duplicate EDTA tubes and frozen at -20°C until analysis. The analysis method employed was a homogenous enzyme immunoassay (DIMENSION®; Siemens Healthcare Diagnostic, Frimley Camberley, UK). The lower and upper quantification limit was 2 and 30 ng/ml, respectively. Results above this upper limit were diluted to obtain concentrations between 2 and 30 ng/ml.

PK and statistical analyses

The PK data analysis was performed using a non-compartmental model in the WinNonlin 2.0 program (Pharsight Corp, Cary, NC). The AUC_{0-24} was calculated using the trapezoidal rule. We obtained maximum tacrolimus blood concentration (C_{max}), tacrolimus concentration immediately following administration (C_0) and 12 h after administration (C_{12}) and time to reach C_{max} (T_{max}) directly from the raw data values. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics ver. 19 (SPSS, Chicago, IL) using a nonparametric analysis.

Differences in tacrolimus concentrations and $C_{\text{max}}-C_{\text{min}}$ fluctuations were calculated using a t test. Fluctuations were calculated by $(C_{\text{max}} - C_{\text{min}})/C_{\text{min}}$. Prograf fluctuations were calculated for the morning and the evening dose using the C_{max} and C_{min} of each dose; for Advagraf we used C_{max} and C_{24} .

One-year follow-up

After the PK study was completed, follow-up visits with the patients were conducted at the clinic as per protocol. Laboratory data taken on the visits closest to follow-up days 30, 90, 180 and 360 were retrieved from the Hospital La Paz electronic laboratory system. All relevant clinical events were collected, including rejection episodes, graft dysfunction and hospitalisation.

Table 1 Demographic characteristics of patient cohort

Demographic characteristics	Values
Gender (% male:female)	57/43
Race (<i>n</i>)	
Caucasian	17
Hispanic	1
Asian	2
Arabian	1
Mean age (years) ^a	12.29±4.17 (4–17)
Mean weight (kg) ^a	42.85±15.42 (15.1–3.8)
Mean height (cm) ^a	143.4±18.16 (105–168)
Total daily Prograf dose (mg)	
Mean ± SD	4.8±1.70
Median	4.00
Range	3–10
Time since transplant until conversion (years)	
Mean ± SD	5.390±3.25
Median (range)	4.17 (1.4–13.1)
Primary disease (<i>n</i>)	
Structural disorders	13
Glomerular disorders ^a	2
Hereditary disorders	5
Haemolytic–uraemic syndrome	1

SD, standard deviation

^a Data are presented as the mean ± standard deviation with the range in parenthesis

^b Non-glomerular disorders included dysplasia ($n=13$), hereditary disorders ($n=5$) and systemic haemolytic syndrome ($n=1$)

Table 2 Mean tacrolimus concentration in blood samples collected at different time points after Prograf or Advagraf administration

Time (h)	Prograf (ng/ml)	Advagraf (ng/ml)
0	6.43±1.32	4.96±1.64
12	6.42±1.56	7.51±2.67
24	6.50±1.20	5.26±1.34
Fluctuation (%)		
Morning dose	161.79±93.71*	
Afternoon dose	76.14±56.38	
C_{0-24} period	155.80±84.79	164.98±94.02

C_0 , Tacrolimus blood concentration immediately before administration; C_{12} , C_{24} , tacrolimus blood concentration at 12 and 24 h, respectively, after drug administration

Data are presented as the mean ± SD

* $p<0.001$ for the comparison of fluctuation in the morning vs afternoon dose of prograf

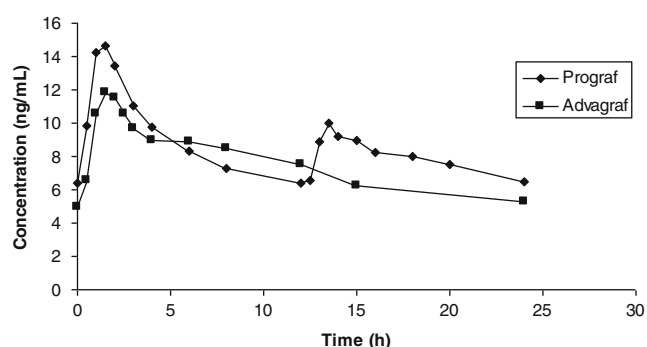


Fig. 1 Mean tacrolimus concentrations in blood at various time points for the two formulations

We compared the tacrolimus doses and concentrations and the laboratory readings for glomerular filtration rate (GFR) levels measured at the time of enrolment in the study with the values measured at each predefined time point (days 30, 90, 180 and 360). The comparisons were conducted using the Wilcoxon test; the alpha adjustment for multiple comparisons was performed with the Bonferroni correction (final alpha error was set at 0.0125).

Results

Twenty-one patients were recruited; their demographic characteristics are shown in Table 1.

Concomitant immunosuppression

All patients were taking two or more drugs concomitantly with tacrolimus. All patients were taking mycophenolate mofetil (0.2–1 g daily) as a complementary immunosuppressant treatment to tacrolimus. Fourteen patients were taking methylprednisolone (1–3 mg daily) and two were taking

deflazacort (1.5–3). In addition to the immunosuppressive treatment, many of the patients were taking food supplements.

PK results and bioequivalence analysis

Table 2 shows the tacrolimus concentrations in the blood samples collected from the patients after the administration of Prograf and Advagraf.

As is shown in Table 2, tacrolimus concentrations at C_0 and C_{24} remained stable, with no significant variability between the two formulations. When we compare the tacrolimus concentration at C_{12} , however, we can see that the concentration is higher after the administration of Advagraf than after the administration of Prograf, which is expected due to Advagraf's slow release formulation. Fluctuations between the peak and trough concentrations were similar for the two formulations ($p=0.741$), but these fluctuations were significantly different when the two doses of Prograf were compared.

Figure 1 shows the mean tacrolimus concentrations achieved by each formulation at the various time points. The tacrolimus concentration can be seen to be more stable when Advagraf is administered, and the levels of Advagraf did not reach as high as those achieved with Prograf.

Using these concentrations and WinNonlin 2.0 software, we calculated the disposition parameters, a number of which are shown in Table 3. Table 3 summarises the main PK values obtained for the two formulations and presents the comparative bioavailability analysis. The 90 % CI calculated for the ratio Advagraf:Prograf with the logarithmic function is shown for both formulation.

Adverse events

None of the patients were lost to follow-up during the PK part of the study or experienced any clinically relevant alteration in

Table 3 Main disposition parameters for Prograf and Advagraf and bioequivalence

Main disposition parameters and bioequivalence ($n=21$)	C_{\max} (ng/mL)		AUC_{0-24} (ng/mL \cdot h $^{-1}$)		T_{\max}	
	Prograf	Advagraf	Prograf	Advagraf	Prograf (h)	Advagraf
Mean \pm SD	16.45 \pm 5.68	13.63 \pm 5.03	202.30 \pm 39.63	178.23 \pm 42.61	2.57 \pm 3.75	3.80 \pm 3.81
Median	15.60	13.80	202.60	177.70	1.50	2.00
Range	9.2–32.2	5.2–26.5	146.8–285.9	106.425–283.4	0.5–15	1–15
Bioequivalence analysis						
	Ratio Advagraf:Prograf		90 % Confidence interval		Power	
			Lower limit	Upper limit		
$\ln(C_{\max})$	81.54		71.60	92.87		80.35
$\ln(AUC_{0-24})$	87.19		79.91	95.13		98.48

Data are presented as the mean \pm SD unless indicated otherwise

AUC_{0-24} , Concentration–time curve for the first 24 h after drug administration; C_{\max} , maximum drug blood concentration; T_{\max} , time to reach C_{\max}

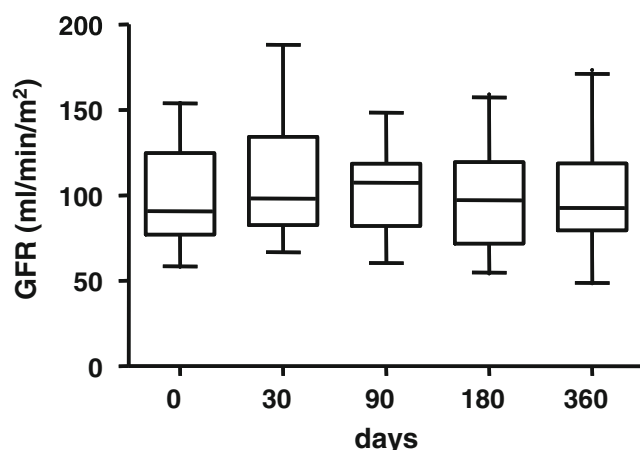


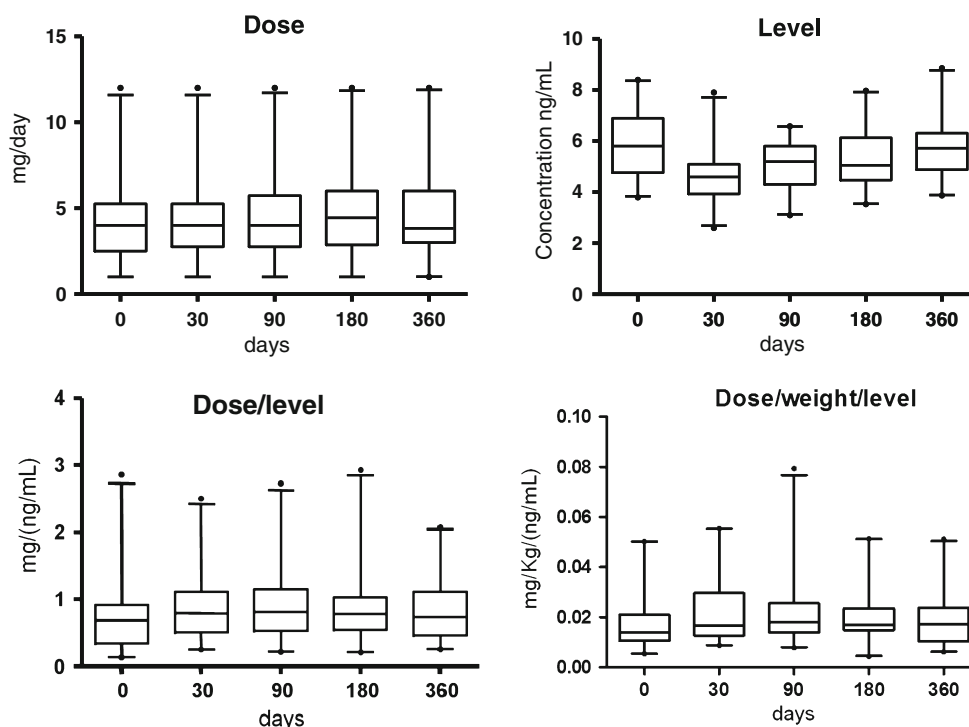
Fig. 2 Box plot showing glomerular filtration rate (GFR) over the course of the first year after conversion from Prograf to Advagraf. Horizontal line in box M median, box 25–75 percentiles; whiskers 5–95 percentiles, points values falling outside these limits

laboratory values. There were no severe adverse effects related to the study drug; however, patient 7 experienced self-limited diarrhoea and patient 17 contracted influenza A, which was treated symptomatically with paracetamol. Both cases were registered in the first 7 days of Advagraf use.

One-year follow-up

One patient left the study having reached 18 years of age 3 months after enrolling in the study; a separate hospital continued the patient's follow-up and therefore he was excluded from the follow-up cohort.

Fig. 3 Box plot showing tacrolimus levels in blood, dose and dose:level ratio over the course of the first year after conversion from Prograf to Advagraf. Horizontal line in box Median, box 25–75 percentiles, whiskers 5–95 percentiles, points values falling outside these limits. Statistically significant differences ($p < 0.0125$) were found between baseline levels and follow-up times as follows: for dose on days 90, 180 and 360; for tacrolimus level on days 30 and 90; for dose to level ratio on days 30, 90 and 180



After 1 year of follow-up, the clinical situation of the 20 patients remained stable. Haemoglobin, albumin and bilirubin levels remained unaltered during the study period. As shown in Fig. 2, the GFR remained stable with no significant changes in renal function. Tacrolimus levels decreased between months 1 and 6. The dose was increased over the course of the follow-up, starting on day 90. Given that the patients included children with significant weight changes, the dose to weight ratio was also calculated and revealed a statistical difference at days 90 and 180 but not at the 1-year time point (see Fig. 3). The dose to level ratio was statistically different at days 30, 90 and 180 and was not significant at the 1-year time-point; a similar trend was observed when this ratio was adjusted for weight.

Discussion

Patients who receive transplants require complex therapeutic regimens, which contribute to a high incidence of medication noncompliance [11–14]. Studies have reported that patient nonadherence to immunosuppressive medication is responsible for 16.3–26.4 % of graft losses and 19.9 % of late acute rejections in adult patients [15, 16]; these rates are even higher in children and teenagers [17]. There is evidence to indicate that compliance increases when patients change from formulations that require multiple dosing to formulations with only one daily dose [18, 19]. Advagraf was developed and is applied in daily clinical practice with the aim of improving patient treatment

adherence. A recent clinical trial confirmed the improvement in compliance when Advagraf was administered to stable renal transplant patients [20].

Several authors have studied the milligram to milligram conversion from Prograf to Advagraf as recommended by the manufacturer and the information sheets provided by the FDA and EMA; however, the results from these studies are conflicting. In the short-term, the results of PK conversion trials conducted in adult patients with renal transplants show a similar disposition of Prograf and Advagraf [5, 6, 21]. However, studies evaluating long-term conversion have observed a decrease in tacrolimus concentrations in the blood after conversion to Advagraf. A number of authors do not recommend increasing the dose [9, 22, 23], but others recommend increasing the Advagraf dose by up to 50 % [7, 8]. Therefore, the long-term dose equivalence after conversion to Advagraf, as compared to the previous Prograf dose, has been questioned [24].

To our knowledge, there are no published conversion studies on child and adolescent patients with renal transplants. A literature search did not identify any studies that reported follow-up information after conversion from Prograf to Advagraf in paediatric renal transplant patients. In our study, the conversion from Prograf to Advagraf on a 1:1 (mg:mg) basis resulted in a slight difference between the PK parameters of the two formulations, with the disposition of Advagraf lower than that of Prograf. Thus, the equivalence interval for the Prograf to Advagraf ratio does not meet the international criteria for bioequivalence; the AUC_{0-24} (79.91–95.13) lies slightly outside the range and the C_{max} (71.60–92.87 mg) falls outside the range even more. These results suggest that a 1:1.2 conversion ratio could be more appropriate in this population.

In our study, a 21 % decrease in tacrolimus levels was observed on days 30 and 90 of follow-up, and a change in tacrolimus dose was observed on day 90 and beyond. Children require re-adjustments in tacrolimus doses as they grow, and therefore the calculation of dose to weight and dose to level ratios adjusted for weight is more appropriate. Dose adjusted by weight values in our study showed a transient change at days 90 and 180 but returned to baseline levels in 1 year. The dose to level ratio changed at day 30 and returned to baseline values by the 1-year follow-up visit, even when adjusted for weight.

Our findings reflect a real although transient change in the disposition of Advagraf. Similar changes have been observed in studies performed on adult patients with renal transplants [21]. The reasons for this transient change in the disposition of tacrolimus are difficult to ascertain. There may be a real though slight infra-equivalence of Advagraf, as suggested by the bioequivalence analysis in our study. Other factors might contribute to these changes, such as (1) the significant growth of younger patients necessitating dose adjustments; (2) changes in the clearance and disposition of

tacrolimus due to developmental changes; (3) a possible regression to the mean, a phenomenon usually seen in these types of studies. In any case, our findings in children with renal transplants confirm the need for close monitoring of tacrolimus levels after conversion. This monitoring is especially important in patients with target drug levels close to the lower limit of the therapeutic range.

After 1 year of follow-up, the patients in our study did not show any deterioration in biochemical parameters, and there were no relevant clinical findings. Only two patients suffered clinical events in the first week after conversion. At the time of writing, about 75 % of our patients have been satisfactorily converted to Advagraf.

Conclusions

This is the first study to evaluate the conversion from Prograf to Advagraf in stable renal paediatric patients. We found differences in disposition between the two formulations, indicating that bioequivalence cannot be ensured in this population. This could have an impact on long-term follow-up, where statistically significant changes in tacrolimus levels and dose are observed. Although the 1-year follow-up demonstrates the safety of this conversion, our results show that close monitoring of tacrolimus levels is needed.

Acknowledgements We thank Armando Campos for his help in tacrolimus determinations and trial monitoring.

References

- Butler JA, Roderick P, Mullee M, Mason JC, Peveler RC (2004) Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review. *Transplantation* 77(5):769–776
- Cross SA, Perry CM (2007) Tacrolimus once-daily formulation: in the prophylaxis of transplant rejection in renal or liver allograft recipients. *Drugs* 67(13):1931–1943
- Russell C, Conn V, Ashbaugh C, Madsen R, Wakefield M, Webb A, Coffey D, Peace L (2011) Taking immunosuppressive medications effectively (TIMELink): a pilot randomized controlled trial in adult kidney transplant recipients. *Clin Transplant* 25(6):864–870
- Dew MA, DiMartini AF, De Vito DA, Myaskovsky L, Steel J, Unruh M, Switzer GE, Zomak R, Kormos RL, Greenhouse JB (2007) Rates and risk factors for nonadherence to the medical regimen after adult solid organ transplantation. *Transplantation* 83(7):858–873
- van Hooff J, Van der Walt I, Kallmeyer J, Miller D, Dawood S, Moosa MR, Christiaans M, Karpf C, Undre N (2012) Pharmacokinetics in stable kidney transplant recipients after conversion from twice-daily to once-daily Tacrolimus formulations. *Ther Drug Monit* 34(1):46–52, Erratum in: *Ther Drug Monit*. 2012 34(4):486
- Meçule A, Tinti F, Poli L, Bachetoni A, Umbro I, Nofroni I, Lai Q, Pretagostini R, Berloco PB, Mitterhofer AP (2011) Tacrolimus

- trough levels and level-to-dose ratio in stable renal transplant patients converted to a once-daily regimen. *Transplant Proc* 43(4):1024–1027
7. Crespo M, Mir M, Marin M, Hurtado S, Estadella C, Guri X, Rap O, Moral R, Puig JM, Lloveras J (2009) De novo kidney transplant recipients need higher doses of Advagraf compared with Prograf to get therapeutic levels. *Transplant Proc* 41(6):2115–2117
8. de Jonge H, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y (2010) Reduced C0 concentrations and increased dose requirements in renal allograft recipients converted to the novel once-daily tacrolimus formulation. *Transplantation* 90(5):523–529
9. Hougardy JM, Broeders N, Kianda M, Massart A, Madhoun P, Le Moine A, Hoang AD, Mikhalski D, Wissing KM, Abramowicz D (2011) Conversion from Prograf to Advagraf among kidney transplant recipients results in sustained decrease in tacrolimus exposure. *Transplantation* 91(5):566–569
10. Hougardy JM, de Jonge H, Kuypers D, Abramowicz D (2012) The once-daily formulation of tacrolimus: a step forward in kidney transplantation? *Transplantation* 93(3):241–243
11. Siegal BR, Greenstein SM (1997) Postrenal transplant compliance from the perspective of African-Americans, Hispanic-Americans, and Anglo-Americans. *Adv Ren Replace Ther* 4(1):46–54
12. Dew MA, Roth LH, Thompson ME, Kormos RL, Griffith BP (1996) Medical compliance and its predictors in the first year after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 15(6):631–645
13. De Geest S, Borgermans L, Gemoets H, Abraham I, Vlaminc H, Evers G, Vanrenterghem Y (1995) Incidence, determinants, and consequences of subclinical noncompliance with immunosuppressive therapy in renal transplant recipients. *Transplantation* 59(3):340–347
14. Hilbrands LB, Hoitsma AJ, Koene RA (1995) Medication compliance after renal transplantation. *Transplantation* 60(9):914–920
15. Denhaerynck K, Dobbels F, Cleemput I, Desmyttere A, Schäfer-Keller P, Schaub S, De Geest S (2005) Prevalence, consequences, and determinants of nonadherence in adult renal transplant patients: a literature review. *Transpl Int* 18(10):1121–1133
16. Schmid-Mohler G, Thut MP, Wüthrich RP, Denhaerynck K, De Geest S (2010) Non-adherence to immunosuppressive medication in renal transplant recipients within the scope of the Integrative Model of Behavioral Prediction: a cross-sectional study. *Clin Transplant* 24(2):213–222
17. Dobbels F, Ruppert T, De Geest S, Decorte A, Van Damme-Lombaerts R, Fine RN (2010) Adherence to the immunosuppressive regimen in pediatric kidney transplant recipients: a systematic review. *Pediatr Transplant* 14(5):603–613
18. Eisen SA, Miller DK, Woodward RS, Spitznagel E, Przybeck TR (1990) The effect of prescribed daily dose frequency on patient medication compliance. *Arch Intern Med* 150(9):1881–1884
19. Weng FL, Israni AK, Joffe MM, Hoy T, Gaughan CA, Newman M, Abrams JD, Kamoun M, Rosas SE, Mange KC, Strom BL, Brayman KL, Feldman HI (2005) Race and electronically measured adherence to immunosuppressive medications after deceased donor renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 16(6):1839–1848
20. Kuypers DR, Peeters PC, Sennesael JJ, Kianda MN, Vrijens B, Kristanto P, Dobbels F, Vanrenterghem Y, Kanaan N, ADMIRAD Study Team (2013) Improved adherence to tacrolimus once-daily formulation in renal recipients: a randomized controlled trial using electronic monitoring. *Transplantation* 95(2):333–340
21. Iaria G, Sforza D, Angelico R, Toti L, de Luca L, Manuelli M, Bellini I, Manzia TM, Anselmo A, Tisone G (2011) Switch from twice-daily tacrolimus (Prograf) to once-daily prolonged-release tacrolimus (Advagraf) in kidney transplantation. *Transplant Proc* 43(4):1028–1029
22. Uchida J, Kuwabara N, Machida Y, Iwai T, Naganuma T, Kumada N, Nakatani T (2012) Conversion of stable kidney transplant recipients from a twice-daily prograf to a once-daily tacrolimus formulation: a short-term study on its effects on glucose metabolism. *Transplant Proc* 44(1):128–133
23. Sañko-Resmer J, Boillot O, Wolf P, Thorburn D (2012) Renal function, efficacy and safety postconversion from twice- to once-daily tacrolimus in stable liver recipients: an open-label multicenter study. *Transpl Int* 25(3):283–293
24. Barraclough KA, Isbel NM, Johnson DW, Campbell SB, Staatz CE (2011) Once- versus twice-daily tacrolimus: are the formulations truly equivalent? *Drugs* 71(12):1561–1577

ORIGINAL ARTICLE

Limited sampling strategies for tacrolimus exposure (AUC_{0-24}) prediction after Prograf[®] and Advagraf[®] administration in children and adolescents with liver or kidney transplants

Gonzalo N. Almeida-Paulo,¹ Rubin Lubomirov,¹ Nazareth Laura Alonso-Sanchez,¹ Laura Espinosa-Román,² Carlota Fernández Camblor,² Carmen Díaz,³ Gema Muñoz Bartola³ and Antonio J. Carcas-Sansuán^{1,4}

¹ Department of Pharmacology, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

² Department of Pediatric Nephrology, La Paz Children's Hospital, Madrid, Spain

³ Service of Pediatric Hepatology and Transplantation, La Paz Children's Hospital, Madrid, Spain

⁴ Clinical Pharmacology Service, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

Keywords

kidney, liver, limited sampling strategies, pediatric, tacrolimus, transplant.

Correspondence

Gonzalo N. Almeida-Paulo PhD, Department of Pharmacology, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain.

Tel.: 0034 67 750 54 27;

fax: 0034 91 497 53 74;

e-mail: gnepaulo@msn.com

Dr. Antonio J. Carcas-Sansuán PhD, Clinical Pharmacology Service, University Hospital La Paz; Department of Pharmacology, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain.

Tel.: 0034 91 497 53 34;

fax: 0034 91 497 53 74;

e-mail: antonio.carcas@uam.es

Conflicts of interests

The authors have declared no conflicts of interest.

Received: 18 October 2013

Revision requested: 24 November 2013

Accepted: 12 May 2014

Published online: 24 June 2014

doi:10.1111/tri.12362

Introduction

Tacrolimus is the first choice immunosuppressant drug used in solid organ transplantation. Blood concentrations of tacrolimus are related to both efficacy and toxicity, but tacrolimus has a narrow therapeutic window and its

Summary

To develop limited sampling strategies (LSSs) to predict total tacrolimus exposure (AUC_{0-24}) after the administration of Advagraf[®] and Prograf[®] (Astellas Pharma S.A, Madrid, Spain) to pediatric patients with stable liver or kidney transplants. Forty-one pharmacokinetic profiles were obtained after Prograf[®] and Advagraf[®] administration. LSSs predicting AUC_{0-24} were developed by linear regression using three extraction time points. Selection of the most accurate LSS was made based on the r^2 , mean error, and mean absolute error. All selected LSSs had higher correlation with AUC_{0-24} than the correlation found between C_0 and AUC_{0-24} . Best LSS for Prograf[®] in liver transplants was $C_{0.1.5.4}$ ($r^2 = 0.939$) and for kidney transplants $C_{0.1.3}$ ($r^2 = 0.925$). For Advagraf[®], the best LSS in liver transplants was $C_{0.1.2.5}$ ($r^2 = 0.938$) and for kidney transplants was $C_{0.0.5.4}$ ($r^2 = 0.931$). Excluding transplant type variable, the best LSS for Prograf[®] is $C_{0.1.3}$ ($r^2 = 0.920$) and the best LSS for Advagraf[®] was $C_{0.0.5.4}$ ($r^2 = 0.926$). Considering transplant type irrespective of the formulation used, the best LSS for liver transplants was $C_{0.2.3}$ ($r^2 = 0.913$) and for kidney transplants was $C_{0.0.5.4}$ ($r^2 = 0.898$). Best LSS, considering all data together, was $C_{0.1.4}$ ($r^2 = 0.898$). We developed several LSSs to predict AUC_{0-24} for tacrolimus in children and adolescents with kidney or liver transplants after Prograf[®] and/or Advagraf[®] treatment.

pharmacokinetics show high variability among patients. Therefore, therapeutic drug monitoring (TDM) is a routine practice for guiding dose adjustment [1].

Tacrolimus TDM is usually performed by measuring trough levels. However, evidence has shown that total exposure to tacrolimus as reflected by the area under the

curve (AUC) may be a better indicator of the drug's efficacy and toxicity, and this parameter has been acknowledged as the best marker of tacrolimus exposure [2,3]. The exact calculation of AUC requires a large number of samples throughout the dosing interval and is therefore not possible in clinical practice. To overcome this problem, the development of limited sampling strategies (LSSs) has been proposed, to allow for an accurate AUC calculation and a practical sampling schedule (up to three samples in a short period around the administration of tacrolimus) [1]. Several schemes have been proposed to predict the tacrolimus AUC_{0-12} after the administration of bid formulation (Prograf®) [4,5].

The new formulation of tacrolimus for administration once daily (Advagraf®) has been introduced into clinical practice in the recent years, on the assumption that a once-daily administration would improve the patient's adherence and therefore would prevent organ rejection and graft loss [6]. This new formulation provides very similar total exposure (as reflected by AUC_{0-24}) when compared with the standard formulation [7–9], but its concentration profile is different.

This means the LSS designed to predict the tacrolimus AUC_{0-12} after Prograf® use could not be valid to estimate the AUC_{0-24} of tacrolimus after the administration of either Prograf or Advagraf®. The development of LSSs to predict the tacrolimus 24-h exposure, considered relevant for adult patients, could be even more relevant in the pediatric population, whose treatment compliance is estimated to be about four times lower than in the adult population [10].

Purpose

The aim of our study was to develop LSSs predicting tacrolimus AUC_{0-24} after the administration of Advagraf® and Prograf® in pediatric patients with stable liver or kidney transplants.

Methods

Design

The data for analysis come from two clinical trials. Both investigated tacrolimus disposition after the administration of Prograf® and Advagraf® (both were approved by the hospital's research ethics committee and were performed following good clinical practice guidelines; informed consent was obtained from all patients); the first study was performed on stable pediatric liver transplant recipients [11], and the second study was performed on stable kidney transplant recipients [12].

In both trials, the patients were converted from Prograf® administration to Advagraf® administration. The eligible patients were 12 to 17 years of age (liver transplant) or 4 to

17 years of age (kidney transplant), with stable liver and kidney function, who had been receiving stable doses of Prograf® twice a day for at least 1 month prior to enrollment. After enrollment, the patients maintained this schedule in a supervised way on days 1 to 7 and were then converted to the same daily dose of Advagraf® (once-daily formulation) on days 8 to 14. Twenty-four-hour pharmacokinetic (PK) profiles were obtained on days 7 and 14 for PK analysis of tacrolimus exposure after each formulation administration.

Pharmacokinetic profiles

Serial blood samples to define the concentration-time profiles were collected at the following times: 0 h (pre-intake) and after the first dose at 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h (second dose), 12.5 h, 13 h, 13.5 h, 14 h, 15 h, 16 h, 18 h, 20 h, and 24 h for Prograf® administration (oral dose twice daily). For Advagraf® administration (oral dose once daily), concentration-time profiles were collected at pre-intake and at 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 15 h, and 24 h.

The PK analysis of tacrolimus was first performed on stable patients with Prograf® treatment (Prograf® taken every 12 h). Patients were then switched to Advagraf® every 24 h, and blood extractions for PK analysis were taken after seven doses of this drug.

Assay methods

The concentration levels of tacrolimus in whole blood samples were determined by a homogenous enzyme immunoassay method (DIMENSION®, Siemens Health Care Diagnostic Ltd., Frimley, Camberley, UK). The quantification range was 2–30 ng/ml.

Pharmacokinetic and statistical analysis

The kinetic data analysis was performed following a non-compartmental model. AUC_{0-24} was calculated by the trapezoidal rule. C_{max} was obtained directly from raw data values.

We used a linear regression analysis to obtain the best time points that correlated with the AUC_{0-24} for Advagraf® and Prograf®. Based on published LSSs and on their utility in clinical practice, we selected the following time points [13]: For modified release tacrolimus formulation (Advagraf®), the points were C0, C1, C1.5, C2, C2.5, C3, and C4; for Prograf®, the time points were C0, C1, C1.5, C2, C3, and C4. All tested LSSs included C0 and a maximum of three extraction time points. Selection of the most accurate LSS predicting AUC_{0-24} was performed based on the r^2 , mean error (ME), and mean absolute error (MAE),

following Bland and Altman [14]. ME would reflect the bias in the prediction and MAE is an estimation of the precision of the regression equation. The ME was calculated as the mean of the differences between the predicted and observed AUC_{0-24} ; the MAE was calculated as the mean of the absolute differences between the predicted and observed AUC_{0-24} ; and the MAE% is expressed as a percentage of the observed AUC_{0-24} . For these parameters, a standard deviation and 95% confidence interval were calculated. Visual observation of residuals and homoscedasticity tests were performed. For each group, we first selected the five LSSs with the best r^2 ; from these five LSSs, we discharged by visual inspection those showing an appreciable bias (ME not centered around zero or with a large 95% CI) and/or with a larger MAE%.

Results

Patient characteristics

Forty-one patients (20 female and 21 male) with stable graft function were included in our study: 20 patients with a liver transplant and 21 patients with a kidney transplant. The patients' primary characteristics are shown in Table 1.

All patients had tacrolimus as the principal immunosuppressive agent. Twenty-three patients were taking prednisolone. Twenty-five patients also received mycophenolate mofetil (MMF). Other drugs taken were clotrimazole (18 patients), deflazacort (two patients), omeprazole (two patients), trimethoprim (one patient), ursodeoxycholic acid (three patients), and valganciclovir (two patients). In addition to the previously referred concomitant drugs,

Table 1. Primary characteristics of the 41 included patients with liver or kidney transplant.

Hepatic Tx (<i>n</i> = 20)	
Gender (%)	
Male/Female	45/55
Race (%)	
White/Black/Hispanic	85/5/10
Age mean \pm SD (range) years	13.90 \pm 1.66 (12–17)
Weight: mean \pm SD (range)	47.86 \pm 9.13 (29.4–67.5)
Height: mean \pm SD (range)	155.10 \pm 8.26 (139–169)
Time post-transplant mean \pm SD (range)	10.30 \pm 4.74 (1–16)
Kidney Tx (<i>n</i> = 21)	
Gender (%)	
Male/Female	57/43
Race (%)	
White/Hispanic/Asian/Arabic	80/5/10/5
Age mean \pm SD (range) years	12.29 \pm 4.17 (4–17)
Weight mean \pm SD (range)	42.85 \pm 15.42 (15.1–63.8)
Height mean \pm SD (range)	143.40 \pm 18.16 (105–168)
Time post-transplant mean \pm SD (range)	5.39 \pm 3.25 (1–12)

SD, standard deviation.

many of the patients were taking food supplements. No changes in concomitant drugs or their dose were performed during the pharmacokinetic study.

Disposition parameters of Prograf® and Advagraf®

Table 2 shows the primary disposition parameters after Prograf® and Advagraf® formulation administration in both types of transplants. Fig. 1 shows the mean blood concentration of tacrolimus. When patients took Prograf®, C_{max} was achieved with the morning administration in most cases. The disposition parameters are quite similar for both formulations in both transplant types, AUC_{0-24} , C_{max} , and T_{max} for Advagraf® being the only pharmacokinetic values significantly higher in liver patients than in kidney patients, but when AUC_{0-24} is adjusted by dose and weight, this difference disappears (Figs 2–5).

LSS analysis in liver and kidney transplantation

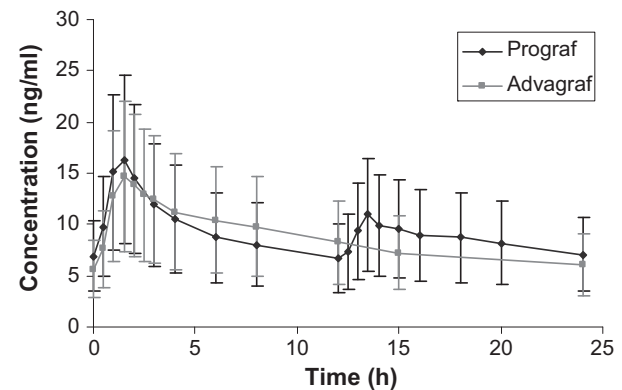
We analyzed all possible LSSs to determine which was optimal: different extraction times for each formulation in both transplant types; both kidney and liver transplants without taking into account the formulation; both the Advagraf® and Prograf® formulations without taking into account the type of transplant; and for all together. The predictive performance of C0 and the best LSSs are shown in the Supplementary Tables.

We first analyzed all the LSS data separately. The r^2 for C0 and AUC_{0-24} was quite low in all cases (lower than 0.739), and systematically showed statistical differences in r^2 and MAE% when compared with the best multiple point LSS selected (see Tables 3–6). Statistical differences between the best five preselected multiple point LSSs were usually not detected because their r^2 was high. However, some of the LSSs had an ME that was biased or had a high 95% CI and were therefore discharged, such as in kidney transplantation with extraction points at 0-1-4 or 0-2-3 when the Prograf® formulation was used; or when the Advagraf® formulation was used in liver transplantation with 0-1.5-2.5 extraction points; or in kidney transplantation with 0-1-4 extraction points. A similar process was performed after inspection of MAE%. As an example, the LSS C0-1-2.5 and C0-0.5-4 for Advagraf® in kidney transplantation had a very similar r^2 (0.930 vs. 0.931); however, differences in MAE% were statistically significant (7.522 ± 3.630 vs. 5.100 ± 3.437 ; paired *t*-test, $P < 0.05$), and therefore, C0-0.5-4 was selected as the preferred LSS. Thus, we considered that the best LSS for Prograf® when used in patients with a liver transplant was the one that used extraction points at 0, 1.5, and 4 h ($r^2 = 0.939$). In patients with a kidney transplant, the best LSS had slightly

Table 2. Primary disposition parameters for tacrolimus after administration of Prograf® and Advagraf® formulations in both kidney and liver transplant.

	Prograf® (mean ± SD)			Advagraf® (mean ± SD)		
	Kidney Tx	Liver Tx	P	Kidney Tx	Liver Tx	Global
AUC ₀₋₂₄ N = 41						
AUC ₀₋₂₄ (ng.h/ml)	202.03 ± 42.61	234.92 ± 68.77	0.063	178.23 ± 42.61	238.50 ± 68.77	207.63 ± 63.91
AUC ₀₋₂₄ (ng.h/ml/ng.Kg)	2546.0.70 ± 1182.201	2571.980 ± 907.385	0.370	2248.106 ± 1043.261	2548.624 ± 731.623	2394.700 ± 906.410
Cl/F (l*/h/Kg)	0.48 ± 0.23	0.46 ± 0.19	0.775	0.56 ± 0.30	0.45 ± 0.16	0.51 ± 0.25
Cl/F (l*/h)	19.81 ± 11.86	21.35 ± 6.80	0.615	25.16 ± 19.17	20.78 ± 7.02	23.02 ± 14.56
C _{max} (ng/ml)	16.45 ± 5.68	19.52 ± 5.51	0.087	13.63 ± 5.03	18.96 ± 5.52	16.23 ± 5.87
T _{max} (h)	1.5 (1-1.5)	1.5 (1-2)	0.897	2 (1.5-6)	1.5 (1.5-2.38)	1.5 (1.5-3)

AUC₀₋₂₄ (ng.h/ml/ng.Kg), AUC₀₋₂₄ adjusted by dose and weight; Cl/F (l*/h/Kg), oral clearance adjusted by weight; Cl/F (l*/h), oral clearance; C_{max}, maximum concentration; T_{max}, time when maximum concentration is achieved; SD, standard deviation.

**Figure 1** Mean tacrolimus blood concentrations, with 25th and 75th percentile, obtained in children and adolescents with a stable kidney or renal transplant ($n = 41$).

lower r^2 and was equal to 0.925 when extraction points at 0, 1, and 3 h are used. For the Advagraf® formulation, we obtained an r^2 of 0.938 and an r^2 of 0.931 when administered to liver or kidney transplant patients, respectively. The extraction points used for patients with a liver transplant were at 0, 1, and 2.5 h, and for patients with a kidney transplant, the extraction points were at 0, 0.5, and 4 h. The equations for the selected LSS and for the C0 are presented in Table 3.

Second, we grouped all data by transplant type. We found a low correlation between C0 and AUC₀₋₂₄ ($r^2 = 0.702$ in liver transplant and $r^2 = 0.569$ in kidney transplant). In this case, from all the possible LSSs analyzed with more than one extraction point, we selected the five with the best r^2 obtained for each transplant (Table 4). Again, small differences in r^2 were found between the selected LSSs. Based on the 95% confidence interval representation of the prediction mean error and the MAE%, we selected C0-2-3 as the best LSS for patients with a liver transplant ($r^2 = 0.913$ and MAE% = 7.48), and for patients with a kidney transplant, the best LSS used points at C0-0.5-4 ($r^2 = 0.898$ and MAE% = 5.790).

For the third analysis, we grouped all data by formulation and developed the LSS without taking into account the transplanted organ (Table 5). In this analysis, we found a low correlation between C0 and AUC₀₋₂₄ ($r^2 = 0.633$ for Prograf® and $r^2 = 0.686$ for Advagraf®). The best LSS for Prograf® was C0-1-3 ($r^2 = 0.920$), and for Advagraf®, the best LSS was C0-0.5-4 ($r^2 = 0.926$).

Finally, we carried out one last analysis of all the collected data with the objective of developing a single LSS for the use in pediatric patients irrespective of the transplant type (kidney or liver) and the formulation used. As with the previous analyses, we found a low correlation between C0 and AUC₀₋₂₄ and a good fit between the different LSSs with more than one extraction point and their AUC₀₋₂₄.

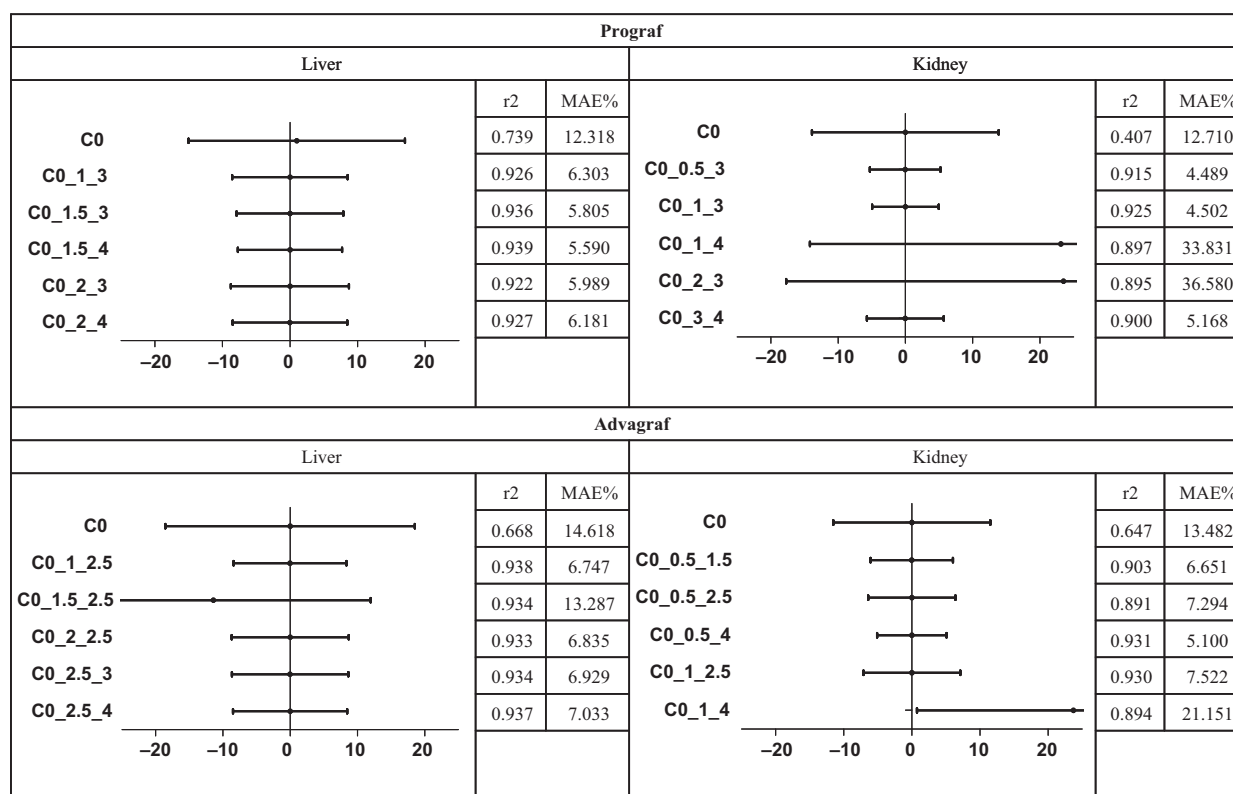


Figure 2 Ninety-five percent confidence interval representation of the mean error, r^2 , and MAE% in the predicted AUC₀₋₂₄, using the best 5 LSSs for Prograf and Advagraf in patients with a liver or kidney transplant.

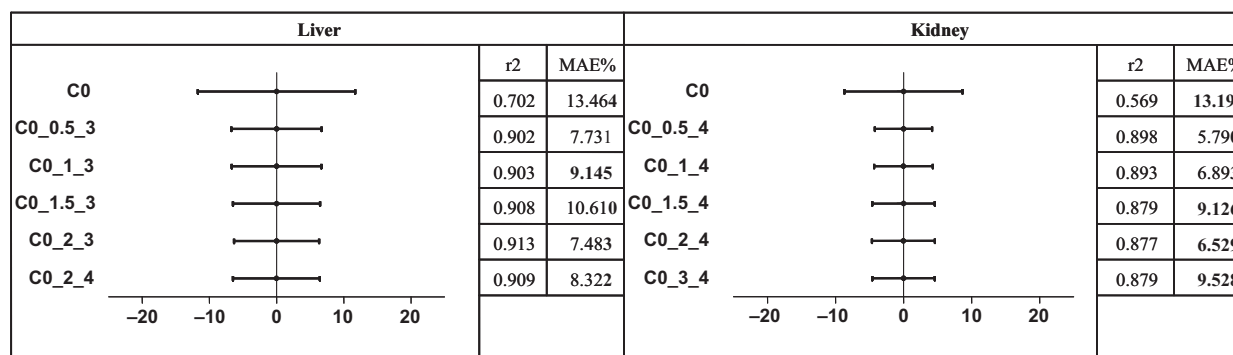


Figure 3 Ninety-five percent confidence interval representation of the mean error, r^2 , and MAE% in the predicted AUC₀₋₂₄ using previous selected LSSs for patients with a liver or kidney transplant.

predictions. All five LSSs had similar r^2 and similar ME and MAE%. We selected C0-1-4 ($r^2 = 0.898$), and its regression equation is shown in Table 6.

Discussion

Studies of patients treated with tacrolimus indicate that, to avoid drug-related rejection and toxicity, it is critical to reach and maintain target blood concentration levels

[15,16]. As shown in Table 2, Prograf[®] and Advagraf[®] formulations have similar disposition parameters, but each requires a different number of daily administrations and the formulations have different concentration profiles. Therefore, the primary objective of this study was to develop LSSs predicting tacrolimus AUC₀₋₂₄; as far as we know, no LSS has been developed for the pediatric population that can predict 24-h tacrolimus exposure after Prograf[®] or Advagraf[®] administration. This is particularly

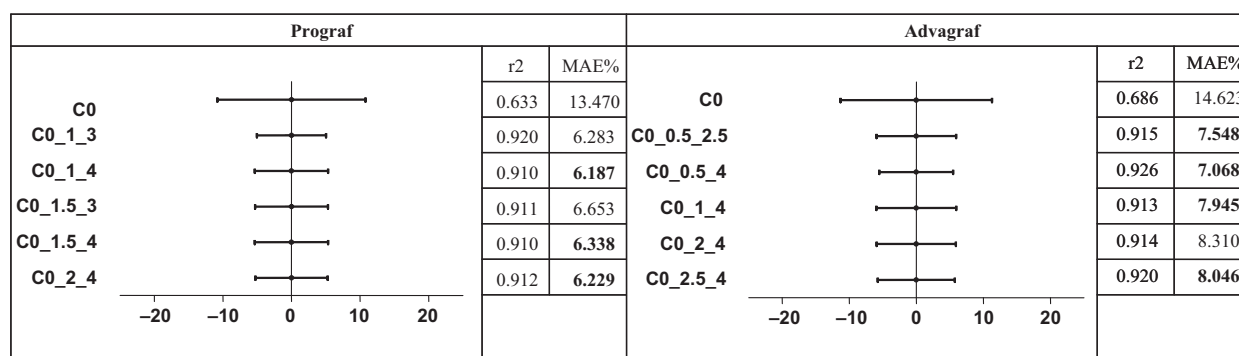


Figure 4 Ninety-five percent confidence interval representation of the mean error, r^2 , and MAE% in the predicted AUC₀₋₂₄, using previously selected LSSs for Prograf and Advagraf formulations.

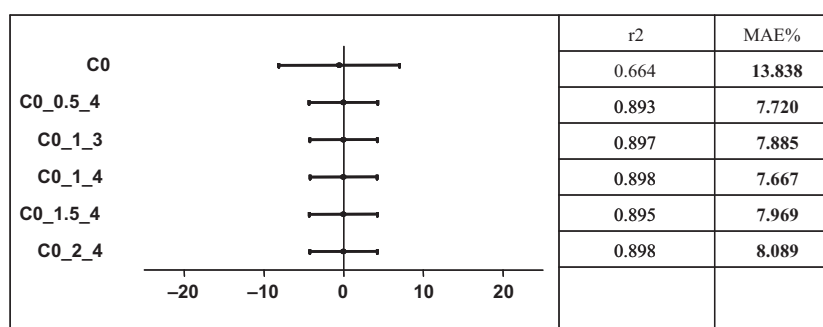


Figure 5 Ninety-five percent confidence interval representation of the mean error, r^2 , and MAE% in the predicted AUC₀₋₂₄, using previously selected LSSs for all data.

important for Advagraf[®] because this formulation is replacing Prograf[®] in clinical practice.

Some older studies predicting tacrolimus AUC₀₋₁₂ have shown a very high r^2 obtained with only C0 [16,17], but prediction of AUC₀₋₁₂ by means of LSS after Prograf[®] administration is better than that obtained with C0 [18–22]. The use of LSSs to calculate AUC₀₋₂₄ after Prograf[®] administration is appealing because it indicates the total daily tacrolimus exposure instead of only the tacrolimus exposure after the morning dose.

In addition, the use of AUC₀₋₂₄ would be useful not only for TDM, but for research purposes. The relationship between a range of AUC values and clinical outcomes is not fully clear at this time, but a consensus document [3] concluded that an AUC₀₋₁₂ target between 150 and 200 ng/ml·h⁻¹ is probably appropriate, although evidence is limited. Also, a recent pooled analysis found no relationship between C0 and acute rejection in renal transplant [23]. This result emphasizes the need to develop tools to better predict total daily drug exposure that can improve tacrolimus dosing and increase the efficacy and safety of its use.

Similar to other authors [24], we found a low correlation between C0 and AUC₀₋₂₄ for both Prograf[®] and Advagraf[®]

that is parallel with higher MAE% in all cases in comparison with those obtained with the different LSSs proposed (Tables 3–6). Also, the percentage of curves with an absolute error in the predicted AUC above 15% or 20% is higher when using C0 in comparison with the selected LSS (Table 7).

Several analyses were carried out to find the best LSS to predict AUC₀₋₂₄ in patients treated with tacrolimus (either Prograf[®] or Advagraf[®] administration) who had a previous kidney or liver transplants. The r^2 , ME, and MAE% were favorable in most of the LSSs selected, with r^2 above 0.90 and MAE% lower than 10%. As previously noted, no LSSs to predict AUC₀₋₂₄ after Prograf[®] administration have been published. Several approaches using Bayesian and multilinear regression (MLR) are in the literature to predict AUC₀₋₂₄ after Advagraf[®] administration in adults, and all showed positive results. Woillard *et al.* [25] developed a single population PK model in adult kidney transplant recipients that in turn was used to develop a Bayesian estimator able to predict tacrolimus interdose AUC following Advagraf[®] or Prograf[®] administration, using concentrations measured at 0 h, 1 h, and 3 h post-dose. A similar approach was used by Benkali *et al.* [26],

Table 3. Best 5 LSSs and C0 LSSs developed for each transplant type and each tacrolimus formulation.

Prograf						
Predictors	Liver	MAE% (<i>n</i> = 20)				Equations
	r^2	Mean	Min	Max	SD	
C0	0.739	12.30819	0.690384	40.11089	8.240373	$Y = 14.483C_0 + 133.242$
C0-C1-C3	0.926	6.303042	0.233525	20.58052	3.677639	$Y = 4.503C_0 + 1.483C_1 + 9.119C_3 + 61.691$
C0-C1.5-C3	0.936	5.80471	0.311822	18.61163	3.57721	$Y = 4.908C_0 + 2.638C_{1.5} + 7.249C_3 + 59.054$
C0-C1.5-C4	0.939	5.589516	0.126788	18.11334	3.426092	$Y = 4.669C_0 + 3.597C_{1.5} + 8.748C_4 + 38.578$
C0-C2-C3	0.922	5.988532	0.055517	19.08913	4.321438	$Y = 5.076C_0 + 2.323C_2 + 7.246C_3 + 69.449$
C0-C2-C4	0.927	6.180506	0.127676	21.19897	3.516408	$Y = 4.933C_0 + 3.841C_2 + 7.88C_4 + 51.707$
Predictors	Kidney	MAE% (<i>n</i> = 21)				Equations
	r^2	Mean	Min	Max	SD	
C0	0.407	12.71018	0.017604	28.84895	5.426805	$Y = 19.129C_0 + 79.233$
C0-C0.5-C3	0.915	4.488515	0.162394	10.76989	3.189111	$Y = 7.974C_0 + 1.836C_{0.5} + 10.149C_3 + 20.461$
C0-C1-C3	0.925	4.501561	0.624655	9.699175	2.741723	$Y = 7.923C_0 + 2.017C_1 + 9.281C_3 + 19.874$
C0-C1-C4	0.897	33.83141	5.398065	98.3974	18.73616	$Y = 6.696C_0 + 1.603C_1 + 12.069C_4 + 18.507$
C0-C2-C3	0.895	36.58041	5.503578	115.107	20.56869	$Y = 8.466C_0 + 1.07C_2 + 9.686C_3 + 26.194$
C0-C3-C4	0.900	5.168134	0.956513	10.06956	2.652792	$Y = 7.348C_0 + 7.288C_3 + 5.65C_4 + 19.085$
Advagraf						
Predictors	Liver	MAE% (<i>n</i> = 20)				Equations
	r^2	Mean	Min	Max	SD	
C0	0.668	14.61761	0.264628	67.58868	8.106019	$Y = 14.449C_0 + 136.06$
C0-C1-C2.5	0.938	6.747053	0.045294	24.51441	3.937699	$Y = 12.243C_0 - 1.593C_1 + 8.06C_{2.5} + 54.394$
C0-C1.5-C2.5	0.934	13.28696	2.004326	42.48581	7.162931	$Y = 11.579C_0 - 0.416C_{1.5} + 7.337C_{2.5} + 52.257$
C0-C2-C2.5	0.933	6.835424	1.701747	23.9125	3.55067	$Y = 11.581C_0 - 0.075C_2 + 7.094C_{2.5} + 49.715$
C0-C2.5-C3	0.934	6.929021	2.578974	25.05787	3.498057	$Y = 11.017C_0 + 5.855C_{2.5} + 1.306C_3 + 51.076$
C0-C2.5-C4	0.937	7.033316	2.219183	24.09748	3.082151	$Y = 11.326C_0 + 5.395C_{2.5} + 2.296C_4 + 45.048$
Predictors	Kidney	MAE% (<i>n</i> = 21)				Equations
	r^2	Mean	Min	Max	SD	
C0	0.647	13.4815	3.041935	36.78929	8.158362	$Y = 20.91C_0 + 74.484$
C0-C0.5-C1.5	0.903	6.650506	1.151705	16.93379	3.850905	$Y = 8.209C_0 + 6.367C_{0.5} + 3.482C_{1.5} + 54.19$
C0-C0.5-C2.5	0.891	7.294103	0.852485	15.73897	3.784086	$Y = 8.953C_0 + 7.03C_{0.5} + 3.375C_{2.5} + 51.818$
C0-C0.5-C4	0.931	5.100428	0.338447	16.45873	3.437357	$Y = 8.025C_0 + 5.294C_{0.5} + 8.428C_4 + 27.97$
C0-C1-C2.5	0.930	7.521946	0.789649	21.25963	3.625576	$Y = 13.162C_0 + 4.546C_1 + 1.774C_{2.5} + 45.992$
C0-C1-C4	0.894	21.15137	0.532591	107.6157	16.93722	$Y = 11.696C_0 + 2.798C_1 + 6.947C_4 + 28.271$

using sampling times at 0 h, 1 h, and 3 h after administration. Niioka *et al.* [27] describe an LSS by MLR using only C0 and C12 ($r^2 = 0.9221$ and MAE% = 7.6%) (Table 8).

The r^2 of our LSS, developed to predict AUC₀₋₂₄, is slightly lower than other proposed LSSs. However, we believe that these differences in r^2 are minor. Also, the MAE% we obtained is similar to that described in the literature and low enough to be considered reasonably accurate and precise.

Our study has some limitations. First, MLR considers the various time points as independent variables, when in fact they are not, and sampling times must be strictly

respected for their valid use; despite these drawbacks, MLR methods have been frequently used in the literature, and they have been shown to be accurate in predicting the “true” AUC, primarily in adults. Second, the number of patients is small; however, the extensive sampling times over the 24-h period after the administration of both formulations allow an appropriate selection of the time points to include in the LSS and encourage a precise calculation of AUC₀₋₂₄, with good internal precision and accuracy. In fact, if we consider the number of cases with absolute deviations higher than 15–20% in the predicted AUC in relation to the real AUC, the LSSs selected are acceptable, and the number of incorrect predictions

Table 4. Best 5 LSSs and C0 LSSs developed for each transplant type, using data from both tacrolimus formulations.

Predictors	Liver					Equations
	r^2	Mean	Min	Max	SD	
C0	0.702	13.46438	0.550444	65.9395	7.927839	$Y = 14.466C_0 + 134.148$
C0-C0.5-C3	0.902	7.731204	0.035125	39.37117	4.020959	$Y = 6.931C_0 + 1.774C_{0.5} + 6.895C_3 + 73.004$
C0-C1-C3	0.903	9.1447	0.967673	36.75901	4.892751	$Y = 7.664C_0 + 1.283C_1 + 6.685C_3 + 67.306$
C0-C1.5-C3	0.908	10.60993	0.084127	45.44014	6.912615	$Y = 7.903C_0 + 1.752C_{1.5} + 6.122C_3 + 62.747$
C0-C2-C3	0.913	7.482981	0.103671	38.41265	4.532379	$Y = 8.062C_0 + 2.850C_2 + 4.763C_3 + 66.882$
C0-C2-C4	0.909	8.322053	0.344451	38.1759	4.807862	$Y = 8.873C_0 + 3.965C_2 + 4.515C_4 + 55.555$

Predictors	Kidney					Equations
	r^2	Mean	Min	Max	SD	
C0	0.569	13.19928	0.504052	36.85074	6.786441	$Y = 19.421C_0 + 79.612$
C0-C0.5-C4	0.898	5.790338	0.206466	16.71073	3.691557	$Y = 7.918C_0 + 2.264C_{0.5} + 10.995C_4 + 23.532$
C0-C1-C4	0.893	6.893472	0.027159	17.12601	4.817117	$Y = 8.810C_0 + 1.822C_1 + 10.074C_4 + 23.100$
C0-C1.5-C4	0.879	9.126351	0.404333	19.91848	4.27705	$Y = 9.614C_0 + 0.718C_{1.5} + 17.231C_4 + 20.771$
C0-C2-C4	0.877	6.528577	0.098347	15.74938	3.422307	$Y = 9.470C_0 - 0.633C_2 + 13.820C_4 + 14.749$
C0-C3-C4	0.879	9.528217	0.4761	22.93833	4.657284	$Y = 9.197C_0 - 1.860C_3 + 14.982C_4 + 16.869$

Table 5. Best 5 LSSs and C0 LSSs developed for Prograf® and Advagraf® using data from both transplant types.

Predictors	Prograf					Equations
	r^2	Mean	Min	Max	SD	
C0	0.633	13.47038	0.882936	33.94488	8.045677	$Y = 15.420C_0 + 114.072$
C0-C1-C3	0.920	6.282808	0.102757	17.33522	3.609771	$Y = 4.496C_0 + 1.867C_1 + 9.507C_3 + 45.945$
C0-C1-C4	0.910	6.187044	0.087025	23.40342	3.998697	$Y = 4.619C_0 + 2.174C_1 + 11.820C_4 + 30.250$
C0-C1.5-C3	0.911	6.652557	0.131056	16.01466	3.385605	$Y = 5.029C_0 + 1.592C_{1.5} + 8.796C_3 + 53.087$
C0-C1.5-C4	0.910	6.338316	0.896596	22.7756	3.397171	$Y = 5.205C_0 + 2.231C_{1.5} + 10.372C_4 + 37.918$
C0-C2-C4	0.912	6.228678	0.310612	20.80034	3.321274	$Y = 5.176C_0 + 3.356C_2 + 8.675C_4 + 43.813$

Predictors	Advagraf					Equations
	r^2	Mean	Min	Max	SD	
C0	0.686	14.62333	0.398848	53.55321	9.575361	$Y = 17.005C_0 + 105.602$
C0-C0.5-C2.5	0.915	7.547901	0.088651	22.04498	4.35629	$Y = 9.188C_0 + 3.975C_{0.5} + 5.391C_{2.5} + 51.663$
C0-C0.5-C4	0.926	7.068407	0.180006	26.63747	4.086203	$Y = 7.970C_0 + 4.179C_{0.5} + 7.679C_4 + 41.490$
C0-C1-C4	0.913	7.945123	0.48714	30.69494	4.362738	$Y = 10.637C_0 + 1.434C_1 + 7.634C_4 + 40.462$
C0-C2-C4	0.914	8.309679	0.239245	29.3464	4.224294	$Y = 10.965C_0 + 1.476C_2 + 7.204C_4 + 41.583$
C0-C2.5-C4	0.920	8.045909	0.262406	27.63689	4.109036	$Y = 11.340C_0 + 2.380C_{2.5} + 5.845C_4 + 43.564$

between the selected LSSs does not reach statistical significance, although there is a tendency against the “global” LSS. Third, an external validation would be advantageous; unfortunately, this validation would require an extensive sampling in a new cohort, which is costly and difficult to perform in these types of patients. Fourth, the range of children’s ages is somewhat different in each transplant type (almost all patients with a liver transplant are adolescents, whereas the age range is wider in patients with kidney transplant). Although this could introduce heterogeneity in LSSs for the use in mixed populations, the

sample gains in representativeness and the MAE% do not appear to be significantly affected if we compare the data in Tables 5–7 with the data in Table 3. As our two studies only include patients from 4 to 17 years old, our results cannot be extrapolated to younger children. The concomitant drugs, as proton pump inhibitors, can also change tacrolimus PK, but we think that these effects should not be appreciated in this kind of analysis (the relationship between punctual drug levels and AUC0-24) and especially in stable patients, that were well controlled and inside the therapeutic window.

Table 6. Best 5 LSSs and C0 LSSs developed when using all data in the same model.

Predictors	r^2	MAE% ($n = 82$)				Equations
		Mean	Min	Max	SD	
C0	0.664	13.83787	0.367477	54.67136	8.722971	$Y = 16.230C_0 + 109.427$
C0-C0.5-C4	0.893	7.72037	0.001259	30.5734	4.405717	$Y = 7.746C_0 + 2.803C_{0.5} + 8.820C_4 + 43.613$
C0-C1-C3	0.897	7.885038	0.087577	32.1104	4.478814	$Y = 8.149C_0 + 2.195C_1 + 6.292C_3 + 53.077$
C0-C1-C4	0.898	7.66713	0.352815	32.0049	4.206705	$Y = 8.772C_0 + 2.297C_1 + 7.926C_4 + 39.179$
C0-C1.5-C4	0.895	7.969032	0.036839	34.40953	3.940411	$Y = 9.343C_0 + 2.106C_{1.5} + 7.303C_4 + 41.992$
C0-C2-C4	0.898	8.089145	0.211239	31.5231	3.879444	$Y = 9.129C_0 + 2.768C_2 + 6.450C_4 + 46.062$

Table 7. Number of predictions outside 15% or 20% in absolute values (MAE%) of the real AUC_{0-24} obtained with C0 and the selected LSS (C0-1-4).

N°	Formulation/Transplant type		20%		15%	
			C0	LSS	C0	LSS
20	Prograf®	Liver	3	0*	6	1*
21		Kidney	2	0	9	0*
20	Advagraf®	Liver	4	1	6	4
21		Kidney	5	0*	7	1*
41	Liver		6	1*	11	5*
41	Kidney		8	0*	17	1*
41	Prograf®		8	0*	16	2*
41	Advagraf®		9	2*	15	2*
82	Global		17	2*	31	8*

* $P < 0.05$ for the comparison LSS using time extraction points at 0, 1, and 4 h vs. C0.

Table 8. Number of predictions outside 15% or 20% in absolute values (MAE%) of the real AUC_{0-24} obtained with C0 and LSS (C0-1-3) for all possible cases.

N°	Formulation/Transplant type		20%		15%	
			C0	LSS	C0	LSS
20	Prograf®	Liver	3	1	6	2*
21		Kidney	2	0	9	0*
20	Advagraf®	Liver	4	0*	6	0*
21		Kidney	5	1*	7	2*
41	Liver		6	0*	11	4*
41	Kidney		8	0*	17	7*
41	Prograf®		8	0*	16	3*
41	Advagraf®		9	3*	15	5*
82	Global		17	3*	31	13*

* $P < 0.05$ for the comparison LSS using time extraction points at 0, 1, and 3 h vs. C0.

The choice between the selected LSSs should be based on the type of patient and should take into account practical considerations. The use of different LSSs for each formulation and each transplant type (2 or 4 different LSSs)

provides a better predictive performance, but is more complex and can be confusing and prone to errors in clinical practice. To select a unique LSS for the use with any type of formulation or transplant is simpler, but its performance is slightly poorer, particularly in the case of liver transplants. In our opinion, the use of a global LSS would be preferred for the use in routine clinical practice because the differences between the selected LSSs are low, and a global LSS would reduce possible mistakes in the selection of an appropriate LSS for each formulation and transplant type. A global LSS is also more convenient from a practical point of view. However, the selection of a specific LSS can be driven by other considerations; for example, the LSS C0-1-3 can be managed more easily than, for example, C0-1-4, a scheme that has also been proposed in adults by different authors [25], thus allowing the use of the same LSS in both populations.

In conclusion, we have developed the first LSS to predict the AUC_{0-24} of tacrolimus in children and adolescents with a kidney or liver transplant after treatment with Prograf® and/or Advagraf®. This could be useful for both routine monitoring and for research purposes.

Authorship

GNA-P: designed research/study, collected data, analyzed data, and wrote the paper. RL: designed research/study, analyzed data, and wrote the paper. NLA-S: collected data, analyzed data, and wrote the paper. LE-R, CFC, CD and GMB: collected data. AJC-S: designed research/study and wrote the paper.

Acknowledgements

We thank Astellas Pharma for its financial support for the tacrolimus determination and the payment of trial insurance; Astellas Pharma did not participate in the design, development, or analysis of the study or in the writing of this article, and the investigators did not receive any other grant for their participation in this trial.

References

- Mendonza AE, Zahir H, Gohh RY, Akhlaghi F. Tacrolimus in diabetic kidney transplant recipients: pharmacokinetics and application of a limited sampling strategy. *Ther Drug Monit* 2007; **29**: 391.
- van der Meer AF, Marcus MA, Touw DJ, Proost JH, Neef C. Optimal sampling strategy development methodology using maximum a posteriori Bayesian estimation. *Ther Drug Monit* 2011; **33**: 133.
- Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit* 2009; **31**: 139.
- Hon YY, Chamberlain CE, Kleiner DE, et al. Evaluation of tacrolimus abbreviated area-under-the-curve monitoring in renal transplant patients who are potentially at risk for adverse events. *Clin Transplant* 2010; **24**: 557.
- Zhu L, Wang H, Rao W, Qu W, Sun L. A limited sampling strategy for tacrolimus in liver transplant patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2013; **51**: 509.
- Gaston RS, Hudson SL, Ward M, Jones P, Macon R. Late renal allograft loss: noncompliance masquerading as chronic rejection. *Transplant Proc* 1999; **31**: 21S.
- EPAR 2007. *Scientific Discussion*. European Medicines Agency: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000712/WC500022237.pdf
- Comuzzi C, Lorenzin D, Rossetto A, et al. Safety of conversion from twice-daily tacrolimus (Prograf) to once-daily prolonged-release tacrolimus (Advagraf) in stable liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2010; **42**: 1320.
- Sañko-Resmer J, Boillot O, Wolf P, Thorburn D. Renal function, efficacy and safety postconversion from twice- to once-daily tacrolimus in stable liver recipients: an open-label multicenter study. *Transpl Int* 2012; **25**: 283. Epub 2012 Jan 13.
- Burra P, Germani G, Gnoato F, et al. Adherence in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2011; **17**: 760.
- Carcas-Sansuán AJ, Hierro L, Almeida-Paulo GN, et al. Conversion from Prograf to Advagraf in adolescents with stable liver transplants: comparative pharmacokinetics and 1-year follow-up. *Liver Transpl* 2013; **19**: 1151.
- Carcas-Sansuán AJ, Espinosa-Román L, Almeida-Paulo GN, et al. Conversion from Prograf to Advagraf in stable paediatric renal transplant patients and 1-year follow-up. *Pediatr Nephrol* 2014; **29**: 117.
- Wallemacq PE, Furlan V, Möller A, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus (FH506) in pediatric liver transplant recipients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1998; **23**: 367.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; **1**: 307.
- Montini G, Ujka F, Varagnolo C, et al. The pharmacokinetics and immunosuppressive response of tacrolimus in paediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2006; **21**: 719.
- Ihara H, Shinkuma D, Ichikawa Y, Nojima M, Nagano S, Ikoma F. Intra- and interindividual variation in the pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in kidney transplant recipients—importance of trough level as a practical indicator. *Int J Urol* 1995; **2**: 151.
- Jørgensen K, Povlsen J, Madsen S, et al. C₂ (2-h) levels are not superior to trough levels as estimates of the area under the curve in tacrolimus-treated renal-transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; **17**: 1487.
- Mahalati K, Belitsky P, Sketris I. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation* 1999; **68**: 55.
- Delaloye JR, Kassir N, Lapeyraque AL, et al. Limited sampling strategies for monitoring tacrolimus in pediatric liver transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2011; **33**: 380.
- Zhao W, Fakhoury M, Baudouin V, Maisin A, Deschênes G, Jacqz-Aigrain E. Limited sampling strategy for estimating individual exposure of tacrolimus in pediatric kidney transplant patients. *Ther Drug Monit* 2011; **33**: 681.
- Velickovic-Radovanovic RM, Paunovic G, Mikov M, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus after the first oral administration in renal transplant recipients on triple immunosuppressive therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; **106**: 505.
- Barracough KA, Isbel NM, Kirkpatrick CM, et al. Evaluation of limited sampling methods for estimation of tacrolimus exposure in adult kidney transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2011; **71**: 207.
- Bouamara R, Shukerb N, Hesselinkb DA, et al. Tacrolimus predose concentrations do not predict the risk of acute rejection after renal transplantation: a pooled analysis from three randomized-controlled clinical trials. *Am J Transplant* 2013; **13**: 1093.
- Saint-Marcoux F, Debord J, Undre N, Rousseau A, Marquet P. Pharmacokinetic modeling and development of Bayesian estimators in kidney transplant patients receiving the tacrolimus once-daily formulation. *Ther Drug Monit* 2010; **32**: 129.
- Woillard JB, de Winter BC, Kamar N, Marquet P, Rostaing L, Rousseau A. Population pharmacokinetic model and Bayesian estimator for two Tacrolimus formulations—twice daily Prograf and once daily Advagraf. *Br J Clin Pharmacol* 2011; **71**: 391.
- Benkali K, Rostaing L, Premaud A, et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of tacrolimus exposure in renal transplant recipients on a new once-daily formulation. *Clin Pharmacokinet* 2010; **49**: 683.
- Niioka T, Miura M, Kagaya H, et al. A limited sampling strategy to estimate the area under the concentration-time curve of tacrolimus modified-release once-daily preparation in renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2013; **35**: 228.

ORIGINAL ARTICLE

Weight of *ABCB1* and *POR* genes on oral tacrolimus exposure in *CYP3A5* nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant

GN Almeida-Paulo¹, I Dapía García², R Lubomirov¹, AM Borobia¹, NL Alonso-Sánchez¹, L Espinosa³ and AJ Carcas-Sansuán¹

Tacrolimus (TAC) is highly effective for the prevention of acute organ rejection. However, its clinical use may be challenging due to its large interindividual pharmacokinetic variability, which can be partially explained by genetic variations in TAC-metabolizing enzymes and transporters. The aim of this study was to evaluate the influence of genetic and clinical factors on TAC pharmacokinetic variability in 21 stable pediatric renal transplant patients. This study was nested in a previous Prograf to Advagraf conversion clinical trial. *CYP3A5*, *ABCB1* and two *POR* genotypes were assessed by real-time PCR. The impact on TAC pharmacokinetics of individual genetic variants on *CYP3A5* nonexpressors was evaluated by genetic score. Explicative models for TAC AUC_{0–24h}, C_{max} and C_{min} after Advagraf were developed by linear regression. The built genetic scores explain 13.7 and 26.5% of the total AUC_{0–24h} and C_{min} total variability, respectively. Patients genetic information should be considered to monitorize and predict TAC exposure.

The Pharmacogenomics Journal advance online publication, 17 January 2017; doi:10.1038/tpj.2016.93

INTRODUCTION

Tacrolimus (TAC) is a calcineurin inhibitor highly effective in preventing acute organ rejection after transplantation.^{1,2} However, TAC administration is complicated with side effects directly related to its drug blood concentrations such as nephrotoxicity, hypertension, hypercholesterolemia and diabetes mellitus.^{3,4} This drug has a high grade of complexity on its use mainly due to its narrow therapeutic index and its high inter and intra subject pharmacokinetic (PK) variability, requiring therapeutic drug monitoring to optimize treatment^{1,5,6} and avoid graft loss and toxicity.⁷

However, despite therapeutic drug monitoring some transplant recipients experience TAC concentrations above or below the therapeutic range and therefore are either at a greater risk for toxicity (those with higher concentrations) or acute rejection (those with lower concentrations). TAC interindividual PK variability depends on many clinical co-variants such as serum levels of albumin, hematocrit and hemoglobin, concomitant use of drugs, post-operative time, as well as genetic factors.^{8–11} TAC presents an extensive hepatic metabolism by cytochrome P450, and its bioavailability is also influenced by the multidrug resistance genotypes (*MDR1* or *ABCB1*).^{12,13} Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CYP3A5* gene explain 40–50% of TAC dose variability.¹⁴ In particular the rs776746 SNP (c.219–237A>G), also referred to as *CYP3A5**3 allele, is a consistent predictor of TAC-dosing requirements. Homozygous carriers of the G allele of this SNP (*CYP3A5* *3/*3) are referred to *CYP3A5* nonexpressors in contrast to *CYP3A5**1 carriers (known as *CYP3A5* expressors) who show normal protein function and therefore lower trough concentrations related to higher metabolic rates.^{10,15–22} The *CYP3A5**3 allele causes an abnormal spliced messenger RNA that

results in protein truncation, a decrease of functional *CYP3A5* enzyme and reduced TAC-dosing requirements.^{23–25}

ABCB1 is thought to be responsible for the low oral bioavailability of TAC and is also involved in the distribution of TAC throughout the body and its excretion.^{14,26,27} However, associations between *ABCB1* genotype and TAC PKs remain unclear. Some authors describe that there is no association between *ABCB1* variations and TAC trough concentrations.^{28–30} However other groups found significant differences between patients with different *ABCB1* genotypes.^{27,31} Up to now, the most studied polymorphism affecting P-glycoprotein expression in human tissue is the silent mutation at position in exon 26 of the gene (c.3435 T>C rs1045642 SNP).³² The CC genotype has been related to a higher expression of P-glycoprotein in the small intestine compared with the TT genotype.³³ Polymorphisms in the P450 oxidoreductase (*POR*) have been recently demonstrated to modulate the activity of P450 enzymes such as *CYP1A2*, *CYP2C19* and *CYP3A*.^{34,35} *POR* seems to be essential for CYP-mediated drug oxidation through electron donation. *POR* is highly polymorphic and more than 100 SNPs have been identified and linked to differential CYP activities. The rs1057868 (c.1508 C>T, *POR**28) is the most common variant of the gene, and has been associated to a reduced protein activity *in vitro*.³⁵ Homozygous *POR**28 carriers (TT-expressors) require higher doses of TAC to maintain similar exposure to the drug when compared with wild-type patients (*POR**1/*1).³⁶ An association between *POR* rs2868177 and *CYP* activity has also been described as it is strongly related to warfarin maintenance dose variations.³⁷

Our main objective was to identify and report the influence of *CYP3A5*, *ABCB1* and two different *POR* polymorphisms on the PKs

¹Department of Clinical Pharmacology, La Paz University Hospital, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain; ²Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), La Paz University Hospital, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain and ³Department of Pediatric Nephrology, La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain. Correspondence: Dr AJ Carcas-Sansuán, Department of Clinical Pharmacology, La Paz University Hospital, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid 28029 Spain.

E-mail: antonio.carcas@salud.madrid.org

Received 12 September 2016; accepted 8 December 2016

2 of TAC in order to describe a simple method for TAC AUC, C_{\max} and C_{\min} prediction in our study population.

MATERIALS AND METHODS

This study was nested in a previous Prograf to Advagraf conversion clinical trial in pediatric patients (EudraCT: 2009-017600-89).³⁸

Twenty-one pediatric patients who underwent kidney transplantation and with stable TAC-based immunosuppressive treatment were included in this study (Table 1). All patients were transplanted at La Paz University Hospital in Madrid, which is a reference hospital for pediatric kidney transplantation. Written informed consent was obtained from all subjects or from their legal tutors. All of them continued with its regular TAC doses and were converted from Prograf to Advagraf following a 1:1 (mg: mg) daily dose relation. Twenty-four hours PK profiles at steady state were obtained for Prograf and Advagraf after 7 days administration. For the first 7 days patients received Prograf and then switched to the same dose of Advagraf.

All patients included in the study had stable renal function, followed stable TAC doses over the past 30 days and none of them had changes in co-medications that could modify TAC PKs.

Table 1. Patients characterization				
Gender (male/female %)		57/43		
Race				
Caucasian (n)		17		
Hispanic (n)		1		
Asian (n)		2		
Arabian (n)		1		
Age (years \pm s.d.)		12.29 \pm 4.17		
Weight (kg \pm s.d.)		42.85 \pm 15.42		
Height (cm \pm s.d.)		143.4 \pm 18.16		
BMI (kg m ⁻² \pm s.d.)		19.87 \pm 3.28		
BSA (m ² \pm s.d.)		1.30 \pm 0.33		
Total Advagraf dose (mg \pm s.d.)		4.8 \pm 1.70		
Time since transplant until conversion (years \pm s.d.)		5.390 \pm 3.25		
Creatinine (mg dl ⁻¹ \pm s.d.)		0.90 \pm 0.29		
Albumin (g dl ⁻¹ \pm s.d.)		3.83 \pm 0.23		
Hemoglobin (g dl ⁻¹ \pm s.d.)		12.23 \pm 1.23		
Cystatin C (mg l ⁻¹ \pm s.d.)		1.23 \pm 0.27		
Bilirubin (mg dl ⁻¹ \pm s.d.)		0.39 \pm 0.12		
Hematocrit (% \pm s.d.)		37.57 \pm 3.54		
eGFR (ml min ⁻¹ \pm s.d.)		76.57 \pm 23.01		
Genetic information				
Variant	Genotype	No.	Study frequency	Population frequency (1000G)
CYP3A5 rs776746 ^a	TT (*1/*1)	1	5%	22,7%
	CT (*1/*3)	3	14%	30,4%
	CC (*3/*3)	17	81%	47%
ABCB1 rs1045642 ^a	GG	7	33%	39,6%
	AG	9	43%	41,7%
	AA	5	24%	18,7%
POR*28 rs1057868	CC (*1/*1)	11	52%	51,1%
	CT (*1/*28)	9	43%	40,5%
	TT (*28/*28)	1	5%	8,3%
POR rs2868177	AA	4	14%	35,8%
	AG	12	57%	48,4%
	GG	5	24%	15,8%

Abbreviations: 1000G, 1000 Genomes Database; BMI, body mass index; BSA, body surface area; eGFR, estimated glomerular filtration rate. ^aCYP3A5 and ABCB1 genes are located in the reverse strand and therefore variants are reported in reverse orientation of the genome.

Abbreviations: 1000G, 1000 Genomes Database; BMI, body mass index; BSA, body surface area; eGFR, estimated glomerular filtration rate. ^aCYP3A5 and ABCB1 genes are located in the reverse strand and therefore variants are reported in reverse orientation of the genome.

Drug concentration measurement and AUC estimation

Advagraf blood samples were gathered before the beginning of the treatment and at 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 15 and 24 h after intake. Whole-blood concentrations were analyzed by enzyme immunoassay method made on the DIMENSION RXL platform (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). The lower and upper limits of quantification were 2 and 30 ng ml⁻¹, respectively. The PK data analysis was performed following a non-compartmental model using WinNonlin Pro 2.0 software (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA). AUC₀₋₂₄ was calculated by the trapezoidal rule.

Genotyping assays

Blood samples were collected from each patient and DNA was extracted using a commercial extraction kit QuickGene DNA Whole Blood Kit S on a QuickGene-810 semiautomatic extractor (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan). All subjects were genotyped for CYP3A5*3 c.219-237A>G (rs776746), ABCB1 c.3435C>T (rs1045642) and two SNPs: c.1508C>T (POR*28, rs1057868) and c.188+6405A>G (rs2868177) in the POR gene using commercial RT-PCR Taqman assays following the manufacturer recommendations (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS: an IBM company, IBM Corporation, Armonk, NY, USA). The differences between genotype groups for each genetic variant were assessed by the nonparametric Jonckheere–Terpstra trend test. The results were considered significant when *P*-values were lower than 0.05. No adjustments for multiple comparisons were performed.

Multivariate linear regression was used to assess the impact of clinical, demographic, concomitant medication and genetic covariates on subject variability of dose- and body weight-adjusted Advagraf PK parameters AUC, C_{\max} and C_{\min} .

Genetic score

Aiming to increase the sensibility to detect the influence of genetic on PK disposition factors in our population a genetic score was built. In order to evaluate the impact of CYP3A5 SNPs on TAC PK parameters the study sample was divided in two groups: CYP3A5 expressors (*1/*1 or *1/*3) and CYP3A5 nonexpressors (*3/*3). Due to the reduced sample size and the physiological plausibility, the contribution of the genetic variants in ABCB1 and POR on TAC PKs was only evaluated in CYP3A5 nonexpressors. An additive genetic score was built using the analysed genetic variants in ABCB1 (rs1045642) and POR (rs1057868 and rs2868177) genes. Three genetic groups were delimited to build the score: one with no variant alleles, another with one or two and a third group with three variant alleles. The differences between CYP3A5 expressors and nonexpressors, as well as between the three genetic score groups were assessed by the nonparametric Jonckheere–Terpstra trend test.

Model building

Two different linear regression models were built. One model including all subjects and a second model for CYP3A5 nonexpressors. Genetic and nongenetic (race, body weight, body height, age, sex, body mass index, body surface area (BSA), hemoglobin, hematocrit, albumin and concomitant treatments) covariates were tested in a step-wise manner. Covariates removal was also performed in a step by step way. To evaluate the bias and precision of our model we calculated dose-/weight-adjusted AUC_{0-24h} and dose-/weight-adjusted C_{\min} (predicted values) in our patients and we compared them with the real ones, determining mean error, mean absolute error and mean absolute error as a percentage of the real value.

All models were built using dose/weight AUC_{0-24h}, C_{\max} and C_{\min} with logarithmic transformation in order to assure a normal distribution of dependant variables.

Same procedures were followed for Prograf before the conversion to Advagraf.

RESULTS

Study population characteristics

Twenty-one stable kidney-transplanted children aged between 4 and 17 years were included in the study. Most of them were

Table 2. Comparison of the main pharmacokinetic parameters adjusted by dose and weight according to the different genotypes analysed

Pharmacokinetic parameter	Variant	Genotype	Mean \pm s.d.	P-value
AUC _{0–24}	CYP3A5 (rs776746) ^a	TT	879.6	0.009
		CT	1232.24 \pm 578.64	
		CC	2507.88 \pm 967.676	
	ABCB1 (rs1045642) ^a	GG	1967.69 \pm 2301.42	0.255
		AG	2301.42 \pm 1253.14	
		AA	2544.74 \pm 950.02	
	POR*28 (rs1057868)	CC	1884.88 \pm 808.24	0.178
		CT	2812.42 \pm 1103.67	
		TT	1164.86	
	POR (rs2868177)	AA	1886.27 \pm 985.47	0.946
AG		2456.11 \pm 1198.81		
GG		2038.38 \pm 667.65		
C _{max}	CYP3A5 (rs776746) ^a	TT	71.28	0.036
		CT	112.16 \pm 34.92	
		CC	175.59 \pm 71.96	
	ABCB1 (rs1045642) ^a	GG	144.47 \pm 48.40	0.922
		AG	182.65 \pm 94.00	
		AA	147.51 \pm 55.49	
	POR*28 (rs1057868)	CC	141.59 \pm 59.24	0.512
		CT	194.54 \pm 78.17	
		TT	84.37	
	POR (rs2868177)	AA	123.04 \pm 54.54	0.413
AG		178.25 \pm 82.09		
GG		152.32 \pm 53.27		
C _{min}	CYP3A5 (rs776746) ^a	TT	33.17	0.004
		CT	29.96 \pm 11.70	
		CC	95.38 \pm 33.79	
	ABCB1 (rs1045642) ^a	GG	60.87 \pm 24.28	0.055
		AG	87.14 \pm 46.99	
		AA	106.85 \pm 33.31	
	POR*28	CC	71.06 \pm 34.40	0.388
		CT	99.19 \pm 44.93	
		TT	70.15	
	POR (rs2868177)	AA	70.74 \pm 21.61	0.682
AG		87.42 \pm 48.30		
GG		82.53 \pm 32.27		

^aCYP3A5 and ABCB1 genes are located in the reverse strand and therefore variants are reported in reverse orientation of the genome.

Caucasian males. Study population characteristics are shown in Table 1. Allelic frequencies for CYP3A5, ABCB1 and POR SNPs in our study population are also shown in Table 1. All genetic variants are in Hardy–Weinberg equilibrium.

Pharmacokinetic and pharmacogenetic results

For this analysis we selected AUC_{0–24h}, C_{max} and C_{min} as the main PK parameters adjusted by daily dose administered and body weight.

As shown in Table 2 and Figure 1 the univariate analysis found significant differences in AUC_{0–24h}, C_{max} and C_{min} between different genotypes of CYP3A5 (CYP3A5*3, rs776746). CYP3A5 nonexpressors (CYP3A5*3/*3, *n* = 17) presented a C_{max}, AUC_{0–24h} and C_{min} 72, 119 and 210% higher than expressors (CYP3A5*1/*1 or *1/*3). No other significant differences were observed.

In order to evaluate the contribution of the genetic variants in ABCB1 and POR genes we selected the 17 CYP3A5 nonexpressors

(CYP3A5*3/*3) and built a three-group additive genetic score. The genetic score groups includes subjects with 0 (group 1, reference), 1 or 2 (group 2) SNPs in POR, and 3 (group 3) variants in ABCB1 and POR genes. Mean values for TAC PK parameters for these three groups are shown in Table 3. Group 2 (carriers of 1 or 2 POR genes variant alleles) have a C_{max}, AUC_{0–24h} and C_{min} 43, 27 and 11% higher than subjects in group 1, respectively (Table 3 and Figure 2). The C_{max}, AUC_{0–24h} and C_{min} observed in group 3 are 94, 82 and 68% higher than subjects without variant alleles (group 1), respectively (Table 3). Comparing the AUC_{0–24h}, C_{max} and C_{min} values of each group we can find significant differences between them (*P* = 0.018, *P* = 0.037 and *P* = 0.018, respectively) (Table 4).

Explicative models

A multivariate linear regression was used to evaluate the contribution of genetic and nongenetic factors to daily dose and body weight-adjusted C_{max}, AUC_{0–24h} and C_{min} variability. In

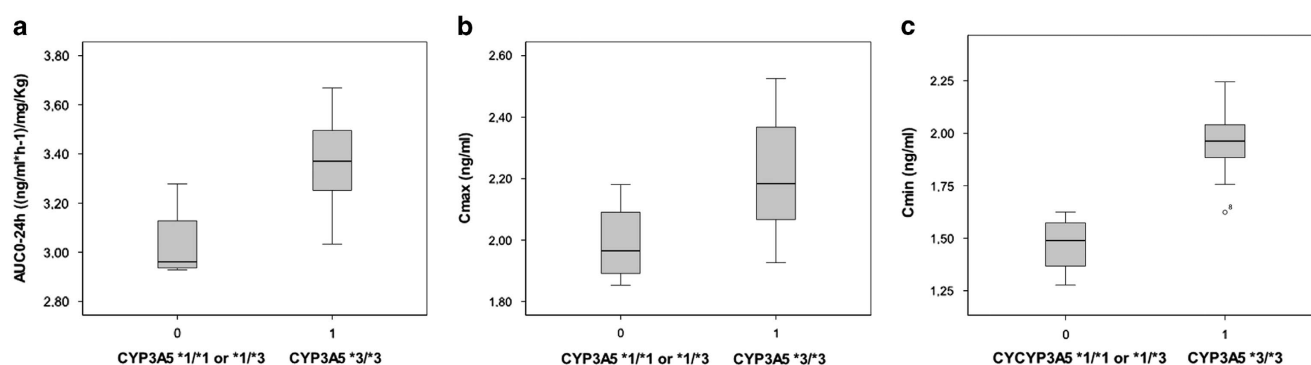


Figure 1. Pharmacokinetic parameters in *CYP3A5* (*CYP3A5**1/*1 or *1/*3 and *CYP3A5**3/*3) genotypes ($n=21$). (a) Dose-/weight-adjusted AUC_{0-24h} . (b) Dose-/weight-adjusted C_{max} . (c) Dose-/weight-adjusted C_{min} .

Table 3. Pharmacokinetic parameters in *CYP3A5* expressors and nonexpressors, and by genetic score in *CYP3A5* nonexpressors

Variants		<i>CYP3A5</i> *1/*1 or *1/*3 $n=4$	<i>CYP3A5</i> *3/*3 $n=17$	Genetic score of the <i>CYP3A5</i> nonexpressors		
				0 $n=2$	1–2 $n=10$	3 $n=5$
$AUC_{0-24}/\text{dose/weight}$	Mean \pm s.d.	1144.09 \pm 504.28	2507.86 \pm 967.68	1805.65 \pm 530.37	2308.53 \pm 824.63	3295.26 \pm 915.10
$C_{max}/\text{dose/weight}$	Mean \pm s.d.	101.94 \pm 35.08	175.58 \pm 71.96	115.63 \pm 23.80	165.72 \pm 61.00	224.76 \pm 79.75
$C_{min}/\text{dose/weight}$	Mean \pm s.d.	30.76 \pm 9.69	95.38 \pm 33.79	76.01 \pm 29.40	84.48 \pm 19.97	128.11 \pm 36.36

Genetic score: 0, any variant allele in *ABCB1* or *POR*; 1–2, one or two genes with at least one variant allele in *ABCB1* or *POR*; 3, all three genes with at least one variant.

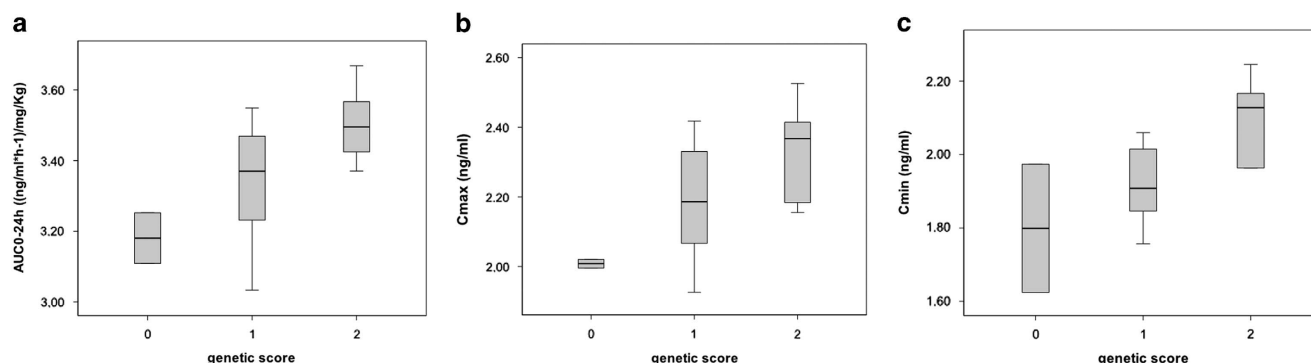


Figure 2. Pharmacokinetic parameters by genetic score ($n=17$). (a) Dose-/weight-adjusted AUC_{0-24h} . (b) Dose-/weight-adjusted C_{max} . (c) Dose-/weight-adjusted C_{min} .

Table 4. Jonckheere–Terpstra trend test performed for the 17 patients, *CYP3A5* nonexpressors for all the remaining three genetic variants and for the built score

Variant	Pharmacokinetic parameter	Jonckheere–Terpstra trend test (p)
<i>ABCB1</i> (rs1045642)	AUC_{0-24h}	0.507
	C_{max}	0.965
	C_{min}	0.102
<i>POR</i> *28 (rs1057868)	AUC_{0-24h}	0.262
	C_{max}	0.575
	C_{min}	0.852
<i>POR</i> (rs2868177)	AUC_{0-24h}	0.715
	C_{max}	0.235
	C_{min}	0.273
Genetic score	AUC_{0-24h}	0.018
	C_{max}	0.037
	C_{min}	0.018

the model including the whole-study population ($n=21$) the three retained covariates were: *CYP3A5* rs776746 SNP and Deflazacort and methylprednisolone co-medications. *CYP3A5* nonexpressors (*CYP3A5**3/*3) showed increased TAC PK parameters and *CYP3A5* genotype explained 39.6, 20.6 and 59.5% of AUC_{0-24h} , C_{max} and C_{min} variability, respectively (Table 5). Deflazacort and methylprednisolone co-medications were related to decreased TAC PK parameters. Deflazacort explained 20.9 and 19.5% of AUC_{0-24h} and C_{max} variability, respectively, and methylprednisolone explained 14.3% of the AUC_{0-24h} variability (Table 5).

A second model was built for the subgroup of *CYP3A5* nonexpressors (*CYP3A5* *3/*3, $n=17$) in order to assess the effect of the genetic variants in *ABCB1* and *POR* genes through a genetic score. Genetic variants explained 13.7% of total AUC_{0-24h} variability. On the other hand, Deflazacort and methylprednisolone co-medications explained 32 and 11.1% of total AUC_{0-24h} variability. The genetic score was the only significant covariate in case of C_{min} explaining 26.5% of its variability. None of the genetic and nongenetic covariates included in this study were found to explain a significant part of C_{max} variability.

Table 5. Developed models with respective MAE%

Model	Non-standardized coefficients	Standardized coefficients	P-value	Explained variability (%)	MAE% mean (IQR)
	$B \pm \text{s.e.}$	Beta			
All participants (n = 21)					
$AUC_{0-24} r_c^2 = 0.571$					
(Constant)	3.179 ± 0.083		0.000		25.78 (7.13–34.88)
CYP3A5	0.371 ± 0.089	0.519	0.001	39.6%	
Methylprednisolone	-0.212 ± 0.080	-0.436	0.017	14.3%	
Deflazacort	-0.376 ± 0.121	-0.513	0.006	20.9%	
$C_{max} r_c^2 = 0.365$					
(Constant)	2.115 ± 0.088		0.000		25.63 (9.43–40.57)
CYP3A5	0.246 ± 0.094	0.519	0.018	20.6%	
Methylprednisolone	-0.172 ± 0.085	-0.436	0.059	–	
Deflazacort	-0.325 ± 0.127	-0.513	0.021	19.5%	
$C_{min} r_c^2 = 0.604$					
(Constant)	1.527 ± 0.090		0.000		27.66 (6.91–40.22)
CYP3A5	0.504 ± 0.095	0.827	0.000	59.6%	
Methylprednisolone	-0.093 ± 0.086	-0.184	0.295	–	
Deflazacort	-0.143 ± 0.130	-0.175	0.285	–	
CYP3A5 nonexpressors (n = 17)					
$AUC_{0-24} r_c^2 = 0.573$					
(Constant)	3.390 ± 0.090		0.000		18.07 (7.34–26.91)
Genetic score	0.117 ± 0.050	0.413	0.035	13.7%	
Methylprednisolone	-0.174 ± 0.081	-0.424	0.050	11.1%	
Deflazacort	-0.474 ± 0.140	-0.639	0.005	32.0%	
$C_{max} r_c^2 = 0.367$					
(Constant)	2.209 ± 0.129		0.000		22.36 (5.96–32.53)
Genetic score	0.115 ± 0.060	0.410	0.078	–	
Methylprednisolone	-0.148 ± 0.098	-0.363	0.153	–	
Deflazacort	-0.352 ± 0.169	-0.478	0.058	–	
$C_{min} r_c^2 = 0.403$					
(Constant)	1.860 ± 0.109		0.000		21.11 (6.90–28.98)
Genetic score	0.136 ± 0.050	0.558	0.019	26.5%	
Methylprednisolone	-0.067 ± 0.082	-0.189	0.429	–	
Deflazacort	-0.239 ± 0.142	-0.375	0.116	–	

Abbreviations: AUC, area under the curve; IQR, interquartile range; MAE, mean predicted absolute error.

Model evaluation

Using the developed models for daily dose and body weight-adjusted C_{\max} , AUC_{0-24h} and C_{\min} the mean predicted absolute error for each model was calculated. The mean predicted absolute error expressed as percentage for C_{\max} , AUC_{0-24h} and C_{\min} is shown in Table 5. Similar results were found for the Prograf formulation and are presented in Supplementary Material.

DISCUSSION

Optimization of therapeutic strategies through individual genetic information can maximize therapeutic efficacy and reduce adverse drug reactions,^{39,40} thus contributing to the development of personalized medicine.

TAC shows a large interindividual variation in oral bioavailability ranging from 4 to 89%.⁷ A significant amount of this variability is explained by genetic variants affecting the drug metabolizing enzymes CYP3A4/5, genes regulating their activity as well as those genetic variants in cellular transporters as *ABCB1*.^{10,11,13,23,41}

The aim of this project was to explore the impact of genetic and clinical factors in the exposure to TAC in kidney-transplanted children. As far as we know this is the first study assessing the joint influence of *CYP3A5* (*rs776746*), *POR* (*rs1057868* *POR*28* and

rs2868177) and *ABCB1* (*rs1045642*) in the disposition of TAC after the administration of both Prograf and Advagraf. Advagraf results are reported in the main body of the article. Information about the Prograf study is reported in the Supplementary Material.

In a first univariate analysis with all 21 patients (Table 2) we found that the only genetic variant significantly related to TAC disposition is the *rs776746* SNP (*CYP3A5*3* allele) affecting all three PK parameters analysed (dose weight-adjusted AUC_{0-24h} , C_{\max} and C_{\min}) and showing a clear gene-dose response. This confirms the major impact of this polymorphism in the disposition of TAC. This fact has been well described in the literature.^{10,11,13,15–17,19,20}

We therefore performed a multivariate analysis including all the patients ($n = 21$) and found that *CYP3A5*3* genotype explains 40, 21 and 60% of variability in daily dose and body weight-adjusted AUC_{0-24h} , C_{\max} and C_{\min} , respectively, in stable renal transplant children receiving one-daily TAC formulation (Advagraf) (Table 5). Similar results were found for Prograf (see Supplementary Table 1S to Supplementary Table 3S presented in Supplementary Material). These findings are in agreement with previous published results by de Jonge *et al.*⁴² in adult stable Prograf-treated renal allograft recipients, where *CYP3A5*3* (*rs776746*) explains more than 29% of the TAC dose requirements. The well-known *CYP3A* activity

inducers Deflazacort and methylprednisolone were the only nongenetic covariates retained in the model. Deflazacort and methylprednisolone explain 21 and 14% of variability in adjusted AUC_{0-24hr} , respectively (Table 5). Only Deflazacort was retained in the case of C_{max} , explaining 20% of its variability. C_{min} variability was not influenced by these co-medications. No other clinical, biochemical or demographic variables explain a significant part of TAC exposure variability. Some authors have described that hematocrit could explain up to 14 and 11% of TAC clearance and dose-adjusted AUC_{0-12hr} , respectively.⁴² The discrepancy found in our study may be due to the reduced sample size and low variability in the hematocrit values among our patients (CV % = 9.4%).

Recently CYP3A4*22 has been described as a determinant genetic factor influencing TAC total exposure, as this variant increases the formation of the non-functional CYP3A4 splice variant.^{3,14,42,43} We did not evaluate these variants as we considered that its low frequency (minor allele frequency = 0.025) made it very unlikely to be found in our cohort due to the number of patients included (we would require at least twice the patients to find more than 1 carrier). We therefore assumed that all patients were wildtype for CYP3A4 (CYP3A4*1/*1) for the interpretation and evaluation of our results.

The influence of ABCB1 polymorphisms on TAC PKs has been extensively investigated; however the results are still controversial.^{27,30} Rong et al.⁴⁴ describe that ABCB1 variants have no effect on TAC exposure, whereas some others found that patients homozygous for allele C (rs1045642) would require higher daily doses of TAC to obtain levels into the therapeutic range when compared with the T allele carriers.²⁶ In our determinations we haven't found any significant difference between the different ABCB1 (rs1045642) genotypes (Table 2).

POR is a membrane-bound coenzyme that functions as an electron donor for the CYP enzymes, therefore genetic variability in this gene may be related to CYP3A enzymatic activity variations. De Jongue et al.³⁶ and Gijzen et al.⁴⁵ found that POR*28 T allele carriers had significantly higher TAC dose requirements in CYP3A5 expressors (CYP3A5*1 carriers) but not in CYP3A5 nonexpressors (CYP3A5*3/*3). However, Elens et al.⁴¹ found that POR*28 homozygosity (CC) was related to a significant higher CYP3A4 activity in CYP3A5 nonexpressors for TAC metabolism. We found no significant differences in dose weight-adjusted AUC_{0-24hr} , C_{max} or C_{min} in patients with different POR*28 genotypes ($P=0.178$, $P=0.512$ and $P=0.388$, respectively) but like Elens et al.⁴¹ we did find an increasing trend in these parameters in POR*28 carriers (Table 2). Recently, an intronic polymorphism (rs2868177) in POR gene was related to higher warfarin maintenance dose needs (mutated patients require lower doses)³⁷ but in a univariate analysis we found no significant relation between the TAC PK parameters and the different POR rs2868177 genotypes (Table 2).

Figure 1 shows there is a great variability in the TAC PK parameters dose-adjusted AUC_{0-24} and C_{max} mainly in CYP3A5 nonexpressors (CYP3A5*3/*3). In addition, due to the majority of CYP3A5 nonexpressors in Caucasian population we decided to study this variability only in this group of patients ($n=17$).

To increase the sensibility of our statistical analysis we developed an additive genetic score using the analysed genetic variants in ABCB1 (rs1045642) and POR (rs1057868 and rs2868177) and we found significant differences in TAC PK parameters between different ABCB1 and POR genotypes (Table 4 and Figure 2).

By applying the built genetic score in a multivariate analysis we found that this variable explains 14 and 27% of the daily dose and body weight-adjusted AUC_{0-24hr} and C_{min} , variability, respectively (Table 5). The concomitant administration of Deflazacort and methylprednisolone explained 32 and 11% of daily dose and body weight-adjusted AUC_{0-24hr} variability (Table 5).

To our knowledge, this is the first multivariate model developed, for pediatric population with kidney transplant, for daily dose and body weight-adjusted TAC PK parameters. The mean absolute error of all models is lower than 28% indicating that if these results are replicated in another independent pediatric population the models could be used in clinics to improve TAC exposure prediction.

Similar results have been found for the Prograf formulation (Supplementary Material). This study confirmed that CYP3A5 genetic variants have a major effect in TAC-dosing requirements, with CYP3A5 genotype explaining ~21% of C_{max} and 60% of C_{min} variability. Nonetheless, our results show that some previously reported SNPs in ABCB1 (rs1045642) and POR (rs1057868 and rs2868177) may explain residual variability in response to TAC in CYP3A5 nonexpressors and shouldn't be underestimated when evaluating TAC exposure.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2003; **63**: 1247–1297.
- 2 First MR. Tacrolimus based immunosuppression. *J Nephrol* 2004; **17** (Suppl 8): S25–S31.
- 3 Kershner RP, Fitzsimmons WE. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 1996; **62**: 920–926.
- 4 Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R, Matas AJ. An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation* 1996; **62**: 900–905.
- 5 Felipe CR, Silva HT, Machado PG, Garcia R, da Silva Moreira SR, Pestana JO. The impact of ethnic miscegenation on tacrolimus clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Clin Transplant* 2002; **16**: 262–272.
- 6 Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; **56**: 23–46.
- 7 Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; **29**: 404–430.
- 8 Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc* 1999; **31**: 296–298.
- 9 Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J et al. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred *de novo* renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2004; **43**: 741–762.
- 10 Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation* 2005; **80**: 977–984.
- 11 Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M, Brandt D, Van Kerckhove V, Malaise J et al. The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and ABCB1 on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function. *Clin Chem Lab Med* 2006; **44**: 1192–1198.
- 12 Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1889–1896.
- 13 Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2006; **16**: 659–665.
- 14 Tang JT, Andrews LM, van Gelder T, Shi YY, van Schaik RH, Wang LL et al. Pharmacogenetic aspects of the use of tacrolimus in renal transplantation: recent developments and ethnic considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2016; **12**: 555–565.
- 15 Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and

- concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; **76**: 1233–1235.
- 16 Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P et al. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am J Transplant* 2003; **3**: 477–483.
- 17 Goto M, Masuda S, Kiuchi T, Ogura Y, Oike F, Okuda M et al. CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 471–478.
- 18 MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; **4**: 914–919.
- 19 Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; **78**: 1182–1187.
- 20 Zhang H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith BP et al. Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol* 2004; **44**: 135–140.
- 21 MacPhee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; **79**: 499–502.
- 22 Numakura K, Satoh S, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Kakinuma H et al. Clinical and genetic risk factors for posttransplant diabetes mellitus in adult renal transplant recipients treated with tacrolimus. *Transplantation* 2005; **80**: 1419–1424.
- 23 Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 383–391.
- 24 Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**: 1271–1294.
- 25 Op den Buijsch RA, Christiaans MH, Stolk LM, de Vries JE, Cheung CY, Undre NA et al. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; **21**: 427–435.
- 26 Ayrtton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 2001; **31**: 469–497.
- 27 Yu X, Xie H, Wei B, Zhang M, Wang W, Wu J et al. Association of MDR1 gene SNPs and haplotypes with the tacrolimus dose requirements in Han Chinese liver transplant recipients. *PLoS One* 2011; **6**: e25933.
- 28 Santoro A, Felipe CR, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO, Struchiner CJ, Ojopi EB et al. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in Brazilian renal transplant patients. *Pharmacogenomics* 2011; **12**: 1293–1303.
- 29 Shi XJ, Geng F, Jiao Z, Cui XY, Qiu XY, Zhong MK. Association of ABCB1, CYP3A4*18B and CYP3A5*3 genotypes with the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Chinese subjects: a population pharmacokinetic analysis. *J Clin Pharm Ther* 2011; **36**: 614–624.
- 30 Kim IW, Noh H, Ji E, Han N, Hong SH, Ha J et al. Identification of factors affecting tacrolimus level and 5-year clinical outcome in kidney transplant patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; **111**: 217–223.
- 31 Hawwa AF, McKiernan PJ, Shields M, Millership JS, Collier PS, McElroy JC. Influence of ABCB1 polymorphisms and haplotypes on tacrolimus nephrotoxicity and dosage requirements in children with liver transplant. *Br J Clin Pharmacol* 2009; **68**: 413–421.
- 32 Lopez-Montenegro Soria MA, Kanter Berga J, Beltran Catalan S, Milara Paya J, Pallardo Mateu LM, Jimenez Torres NV. Genetic polymorphisms and individualized tacrolimus dosing. *Transplant Proc* 2010; **42**: 3031–3033.
- 33 Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3473–3478.
- 34 Murakami M. Rupture of renal arterial aneurysm in a pregnant patient. *Masui* 1993; **42**: 1367–1370.
- 35 Agrawal V, Huang N, Miller WL. Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19. *Pharmacogenet Genomics* 2008; **18**: 569–576.
- 36 de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* 2011; **12**: 1281–1291.
- 37 Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. *Drug Metab Dispos* 2011; **39**: 1433–1439.
- 38 Carcas-Sansuan AJ, Espinosa-Roman L, Almeida-Paulo GN, Alonso-Melgar A, Garcia-Meseguer C, Fernandez-Cambor C et al. Conversion from Prograf to Advagraf in stable paediatric renal transplant patients and 1-year follow-up. *Pediatr Nephrol* 2014; **29**: 117–123.
- 39 Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 2006; **57**: 119–137.
- 40 Meyer UA. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet* 2004; **5**: 669–676.
- 41 Elens L, Hesselink DA, Bouamar R, Budde K, de Fijter JW, De Meyer M et al. Impact of POR*28 on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine A in renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 2014; **36**: 71–79.
- 42 de Jonge H, de Loo H, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. In vivo CYP3A4 activity, CYP3A5 genotype, and hematocrit predict tacrolimus dose requirements and clearance in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2012; **92**: 366–375.
- 43 Elens L, Capron A, van Schaik RH, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC et al. Impact of CYP3A4*22 allele on tacrolimus pharmacokinetics in early period after renal transplantation: toward updated genotype-based dosage guidelines. *Ther Drug Monit* 2013; **35**: 608–616.
- 44 Rong G, Jing L, Deng-Qing L, Hong-Shan Z, Shai-Hong Z, Xin-Min N. Influence of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2010; **42**: 3455–3458.
- 45 Gijzen VM, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, Nulman I, Koren G et al. P450 oxidoreductase *28 (POR*28) and tacrolimus disposition in pediatric kidney transplant recipients—a pilot study. *Ther Drug Monit* 2014; **36**: 152–158.

Supplementary Information accompanies the paper on the The Pharmacogenomics Journal website (<http://www.nature.com/tpj>)